

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**AROMATİK KETONLARIN BİTKİ BİYOKATALİZÖRLÜĞÜNDE
ENANTİYOSEÇİMLİ OLARAK BİYOİNDİRGENMESİ İLE (S)-1-FENİL
ETANOL ÜRETİMİ**

Hilal ÇELİK KAZICI

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hilal ÇELİK KAZICI tarafından hazırlanan “**Aromatik Ketonların Bitki Biyokatalizörlüğünde Enantiyoseçimli Olarak Biyoindirgenmesi İle (S)-1-Fenil Etanol Üretimi**” adlı tez çalışması 28/04/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Tülin KUTSAL
Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Serpil TAKAÇ
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Emine Bayraktar
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Zümriye AKSU
Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU
Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

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

02.04.14

Hilal ÇELİK KAZICI

ÖZET

Doktora Tezi

AROMATİK KETONLARIN BİTKİ BİYOKATALİZÖRLÜĞÜNDE ENANTİYOSEÇİMLİ OLARAK BİYOİNDİRGENMESİ İLE (S)-1-FENİL ETANOL ÜRETİMİ

Hilal ÇELİK KAZICI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

Bu çalışmada asetofenonun biyoindirgenmesiyle, birçok farmakolojik ürünün öncü maddesi olan enantiyomerik saflıkta (S)-1-feniletanol üretilmiştir. (S)-1-feniletanol türevleri antialzaymır ilaç etken maddesi olarak da kullanım alanına sahiptir. (S)-1-feniletanolün üretimi, asetofenonun alkoldehidrojenaz (ADH) enzimi biyokatalizli asimetrik indirgenme tepkimesiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, karbonil grubunu indirgeyebilmesi için ADH enzim kaynağı olarak çeşitli meyve ve sebzeler kullanılmıştır. En yüksek aktiviteye sahip olan uygun bitkinin seçimi için, farklı bitkilerin (havuç, patates, üzüm, turp) ADH enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Biyokatalizör olarak en yüksek ADH aktivitesine sahip taze havuç seçilmiştir.

Biyoindirgenme deneyleri, substrat olarak asetofenon içeren 0.1 M sodyum fosfat tampon ortamında, 80 ml hacmindeki vida kapaklı kesikli biyoreaktörlerde, sıcaklık ve karıştırma hızı (150 rpm) kontrol edilen orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. Örnekler yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) ile analizlenmiştir.

Enantiyomerik saflıkta (S)-1-feniletanol üretimi üzerine, taze havuç biyokatalizörlüğünde substrat derişimi, sıcaklık, tepkime süresi, tepkime pH'ı ve hücre derişiminin etkileri araştırılmıştır. İkinci aşamada, biyokatalizör olarak kullanılan taze havuç dondurularak kurutulmuş ve liyofilize havuç elde edilmiştir. ADH enzimi tepkimeyi, taze havuç için 2 mM (0.24 g/L) substrat derişimi, 200 g/L biyokatalizör derişimi, 33 °C tepkime sıcaklığı, pH=7 ve 150 rpm karıştırma hızı koşullarında, % > 99 enantiyomerik aşırılık (ee) ve % 92 dönüşüm (c) ile katalizlemiştir. Liyofilize havuç için ise 0.5 mM (0.06 g/L) substrat derişimi, 30 g/L biyokatalizör derişimi, 33 °C tepkime sıcaklığı, pH=7 ve 150 rpm karıştırma hızı koşullarında, % > 99 ee ve % 78 dönüşüm ile katalizlemiştir. Liyofilize havuç biyokatalizörü için optimum çalışma koşulları Cevap Yüzey Yöntemi ile belirlenmiştir.

Çalışmada, alginat jeline tutuklanmış taze havuç hücreleri ile kesikli sistemde çalışılmıştır. En uygun koşullar 2 mm pellet çapı, 33 °C tepkime sıcaklığı, pH 7 fosfat tamponu ve 48 h tepkime süresi olarak belirlenmiştir. Tutuklanmış taze havuç hücreleri ile sürekli sistemde, asetofenon derişimi 1 mM, 2 mM ve 4 mM değerleri için biyoindirgenme deneyleri gerçekleştirilmiştir. 1 mM (0.12 g/L) başlangıç girdi derişiminde, 0.64 mM (S)-1-feniletanol (% 64 dönüşüm), 2 mM (0.24 g/L) başlangıç girdi derişiminde ise 1.5 mM (S)-1-feniletanol (% 79 dönüşüm) elde edilmiştir. Daha sonra taze havuç, liyofilize havuç ve tutuklanmış taze havuç hücreleri ile kesikli sistemde tepkime kinetiği incelenerek kinetik sabitler belirlenmiştir. Ayrıca, asetofenonun aljinat jelindeki etkin difüzyon katsayısı belirlenmiştir. Dolgulu kolon biyoreaktörün modellenmesi ve çözümü gerçekleştirilmiştir. Modelin çözümü, Matlab paket programı ile yapılmıştır. Kolon boyunca alınan örnekler ile model sonuçları karşılaştırılarak uyum olduğu gözlenmiştir.

Nisan 2014, 223 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyoindirgenme, Asimetrik sentez, (S)-1-feniletanol, Alkoldehidrojenaz, Bitki, Biyokatalizör

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PRODUCTION OF ENANTIOMERICALLY PURE S-1-PHENYL ETHANOL VIA PLANT BIOCATALYTIC REDUCTION OF AROMATIC KETONES

Hilal ÇELİK KAZICI

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

Supervisor: Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU

In this study, enantiomerically pure (S)-1-phenylethanol that the precursor of many pharmacological product was produced with bioreduction of acetophenone. Derivatives of (S)-1-phenylethanol (second alcohol) is used as the active ingredient of drug of antialzheimer. Production of (S)-1-phenylethanol was conducted with the asymmetric reduction reaction of acetophenone using the enzyme of alkoldehidrojenaz (ADH) as biocatalyst. In this study, a variety of fruits and vegetables were used as source of enzyme (ADH) for reduction of the carbonyl Group. ADH enzyme activities were determined of different plants (carrots, potatoes, grapes, radishes) for selection of suitable plant which has the highest intracellular enzyme activity. At the end of this election carrot has been chosen as a biocatalyst which has highest ADH activity. Reactions was performed in 80 ml volume screw cap bioreactor containing acetophenone as substrate. Experiments were performed in temperature and stirring rate controlled orbital shaker. Samples were analyzed using high pressure liquid chromatography (HPLC).

The effects of enzyme source, substrate concentration, temperature, reaction time, pH of the reaction and the amount of biocatalyst on the production of (S)-1-phenylethanol have been investigated. It was found that ADH enzyme in fresh carrots catalysed the bioselective asymmetric reduction reactions at high enantioselectively and high conversion (% > 99 ee ve % 92 conversion) under the conditions of 2 mM (0.24 g/L) substrate concentration, 200 g/L biocatalyst concentration, 33 °C reaction temperature, pH = 7 and 150 rpm stirring rate. Lyophilized carrots catalysed the bioselective asymmetric reduction reactions (% > 99 ee ve % 78 conversion), under the conditions of 0.5 mM (0.06 g/L) substrate concentration, 30 g/L biocatalyst concentration, 33 °C reaction temperature, pH=7 and 150 rpm stirring rate. Optimum operating conditions was determined for lyophilized biocatalyst by Response Surface Methodology.

The kinetic constants were determined by examining reaction kinetics with fresh carrot, lyophilized fresh carrots and immobilized carrot cells. Also, effective diffusion coefficient of acetophenone was determined in alginate gel using immobilized carrot cells in batch system. Before studying in a continuous bioreactor, cells were immobilized by alginate. In continuous system, several levels of substrate concentrations, 1 mM, 2 mM and 4 mM, were studied. At 4 h residence time, 1.5 mM (S)-1-phenylethanol (conversion 79 %) was obtained for 2 mM (0.24 g/L) initial substrate concentration.

A mathematical model of the bioreactor was developed and solved. The samples taken throughout the column was analyzed and the results were compared with the model results.

April 2014, 223 pages

KeyWords: Bioreduction, Asymmetric Synthesis, Acetophenone, (S)-1-Phenylethanol, Alcoholdehydrogenase, Plant, Biocatalyst

TEŞEKKÜR

Engin bilgi birikimi ve anlayışı ile doktora çalışmamı yürüten, çok değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU (Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı)'na yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam için gerekli mali desteği sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne (Proje no: 12B4343010) teşekkür ederim.

Doktora çalışmam süresince, görüşlerinden yararlandığım Tez İzleme Komitesi üyeleri, Sayın Prof. Dr. Serpil TAKAÇ (Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Zümriye AKSU'ya (Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) ayrıca önerilerinden yararlandığım ve samimiyetine sonsuz güvendiğim Sayın Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR'a (Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) ve hayata dair paylaşımlarından zevk duyduğum Sayın Prof. Dr. Afife GÜVENÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm içtenliği ile her anımda yanımda olan ve zor zamanlarımda kurtarıcısı çok değerli dostum Araştırma Görevlisi Rahime SONGÜR'e, yardımseverliği ve samimiyeti ile her an yardımına hazır bulduğum sevgili arkadaşım Dr. Abdulwahap GİWA'ya ve tüm Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

Deneylerimin bir kısmını yapma şansı bulduğum için Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Nahit AKTAŞ ve Yrd. Doç. Dr. Tekin ŞAHAN'a teşekkürlerimi sunarım. Hayatıma girdiği andan itibaren desteğini ve sevgisini hissettiğim, hayatımın en büyük şansı olan sevgili eşime, canım oğluma, hayatımın özü canım anneme ve kız kardeşime sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili kardeşim Devran ÇELİK' e...

Hilal ÇELİK KAZICI

Ankara, Nisan 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1 Sterokimya	6
2.2 Ayna Görüntüleri ve Kirallik.....	6
2.3 Enantiyomerlerin Fiziksel Özellikleri	7
2.3.1 Kiral tanıma terimi	8
2.4 Enantiyomerlerin Saflığını Belirleme Yöntemleri	8
2.4.1 Kiral moleküllerde optikçe aktiflik	8
2.4.1.1 Mutlak konfigürasyona ait r-s tanımlama sistemi	10
2.4.2 Kiral kromatografi yöntemi	14
2.4.3 NMR spektroskopisi.....	15
2.5 Kiral Maddelerin Üretimi	15
2.5.1 Kiral havuz	16
2.5.2 Kimyasal yöntemler	17
2.5.2.1 Kiral substratlar	17
2.5.2.2 Kiral destek.....	17
2.5.2.3 Kiral ayırıcı.....	18
2.5.2.4 Kiral çevre.....	18
2.5.3 Biyoteknolojik yöntemler	18
2.5.3.1 Pro-Kiral bileşiklerden kirale maddeler.....	18
2.5.3.2 Rasematların rezolüsyonu	19
2.5.3.2.1 Kristalizasyon	19

2.5.3.2.2 Kinetik rezolüsyon	20
2.6 Kiral İlaçlar	20
2.7 Enantiyomerik Saflıktaki Kiral Alkoller	22
2.8 Biyotransformasyon ve Kısa Tarihçesi	23
2.9 Biyotransformasyon Proseslerinde Kilit Adımlar.....	24
2.10 Biyotransformasyon ve Enzimler	26
2.11 Enzimin Substratla İlişkisi	29
2.12 Biyotransformasyonda Reaksiyon Tipleri	31
2.13 Biyotransformasyon Çalışmalarında Oksidoredüktazlar	31
2.14 Alkol Dehidrogenaz.....	32
2.15 Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	34
2.16 Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Başlıca Yöntemler	34
2.16.1 Spektrofotometrik yöntem	34
2.16.2 Kromatografik yöntem	35
2.16.3 Kimyasal tayin yöntemi	35
2.16.4 Thunberg yöntemi.....	35
2.17 Basit Enzim Kinetiği için Mekanistik Modeller	36
2.18 İnhibisyon Kinetiği (Substrat İnhibisyonu).....	39
2.19 Tüm Hücre (Whole Cell) ile Biyodönüşüm.....	41
2.20 Tutuklama.....	42
2.20.1 Hapsetme.....	43
2.20.2 Bağlama.....	44
2.21 Tutuklamada Kullanılan Destek Materyalleri	47
2.21.1 Aljinat.....	48
2.22 Tutuklu Enzim Kinetiği.....	49
2.22.1 Kütle aktarım dirençleri etkisi.....	50
2.22.2 Dış kütle aktarım direnci.....	51
2.22.3 Partikül içi kütle aktarım direnci	53
2.23 Biyolojik Jellerin Etkin Difüzivitelemeleri	60
2.24 Hücrelerin Homojenizasyonu	61
2.24.1 Mekanik homojenizasyon yöntemleri	62
2.25 Mekanik Olmayan Homojenizasyon Yöntemleri.....	62

2.25.1 Kimyasal homojenizasyon	62
2.25.2 Fiziksel homojenizasyon	63
2.25.3 Biyolojik homojenizasyon.....	63
2.26 Kurutma ile Homojenizasyon	63
2.26.1 Liyofilizasyon.....	63
2.27 Cevap Yüzey Metodu (RSM)	64
2.28 Biyoreaktörler ve Çeşitleri	69
2.28.1 Karıştırmalı tank biyoreaktörü	70
2.28.2 Pnömatik karıştırmalı biyoreaktörler	71
2.28.3 Membran bioreaktörler	72
2.28.4 Dolgulu yatak biyoreaktörler	73
2.29 Kimya Mühendisliğinde Modelleme.....	74
2.30 Borusal Reaktörlerde Eksenel ve Çapsal Yönde Değişimler	75
2.31 Kaynak Özetleri	78
2.31.1 Bitki hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalar	78
2.31.2 Liyofilize bitki hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalar	95
2.31.3 Tutuklanmış bitki hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalar	98
2.31.4 Mikroorganizmalarla gerçekleştirilen çalışmalar	100
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	112
3.1 Materyal	112
3.2 Yöntem	112
3.2.1 Kalibrasyon grafiği	112
3.2.2 Enzim aktivitesi	112
3.3 Biyoindirgenme Deneyleri	114
3.3.1 Kesikli sistemde serbest biyokatalizör ile biyoindirgenme	114
3.3.2 Taze ve liyofilize havucun hazırlanması	115
3.3.3 Kofaktör rejenerasyonu.....	115
3.3.4 Kesikli sistemde tutuklanmış hücreler ile biyoindirgenme	115
3.3.4.1 Tutuklama yöntemi	116
3.3.4.2 Kalsiyum aljinat derişimi	116
3.3.4.3 Pelletlerin oluşturulması.....	116
3.3.5 Kesikli sistemde etkin difüzyon katsayısının belirlenmesi.....	117

3.3.6 Cevap yüzey yöntemi ile biyoindirgemenin optimizasyonu	119
3.3.7 Sürekli sistemde dolgulu kolon biyoreaktörde tutuklanmış hücreler ile biyoindirgenme	121
3.3.8 Kolon gözenekliliği ve kalma süresinin belirlenmesi.....	122
3.3.9 HPLC analizleri.....	122
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	124
4.1 Enzim Aktivitesi Tayini	124
4.2 Asetofenonun Taze Havuç Biyokatalizörlüğünde Biyoindirgenmesi ile Gerçekleştirilen Çalışmalar	125
4.2.1 Başlangıç substrat derişimi etkisi	126
4.2.3 Sıcaklık etkisi.....	127
4.2.4 Biyokatalizör derişimi etkisi	128
4.2.5 pH etkisi	129
4.2.6 Tepkime süresi etkisi	130
4.2.7 Farklı biyokatalizörlerin etkisi	131
4.2.8 Bitki biyokatalizörünün yeniden kullanılabilirliği.....	132
4.3 Asetofenonun Liyofilize Havuç Biyokatalizörlüğünde Asimetrik İndirgenmesi ile Gerçekleştirilen Çalışmalar	133
4.3.1 Dondurarak kurutma	133
4.3.2 Başlangıç substrat derişimi etkisi	134
4.3.3 Sıcaklık etkisi.....	135
4.3.4 pH etkisi	136
4.3.5 Tepkime süresi etkisi.....	137
4.3.6 Kofaktör rejenerasyonu.....	137
4.4 Tutuklanmış Taze Havuç Hücreleri ile Kesikli Sistemde Gerçekleştirilen Deneyler	140
4.4.1 Pellet çapı etkisi	141
4.4.2 Aljinat Derişimi Etkisi	142
4.4.3 Başlangıç substrat derişimi etkisi	143
4.4.4 Sıcaklık etkisi.....	144
4.4.5 pH etkisi	146
4.4.6 Tepkime süresi etkisi	146

4.4.7 Tutuklanmış biyokatalizörün yeniden kullanılabilirliği	147
4.5 Tutuklanmış Liyofilize Havuç Hücreleri ile Kesikli Sistem Deneyleri	150
4.5.1 Başlangıç substrat derişimi etkisi	150
4.5.2 Tepkime süresi etkisi	151
4.5.3 pH etkisi	152
4.5.4 Sıcaklık etkisi.....	153
4.6 Kesikli Sistemde Liyofilize Hücrelerle Biyoindirgemenin Cevap Yüzey Yöntemiyle (RSM) Optimizasyonu.....	155
4.7 Kinetik Çalışmaları.....	162
4.7.1 Serbest taze havuç biyokatalizörlüğünde enzim kinetiği çalışmaları.....	162
4.7.1.1 Lineweaver-Burk ile doğrusallaştırma	164
4.7.2 Liyofilize havuç biyokatalizörlüğünde enzim kinetiği çalışmaları	166
4.7.3 Tutuklanmış hücrelerde iç ve dış kütle aktarım dirençleri.....	170
4.8 Sürekli Sistemde (S)-1-Feniletanol Üretimi	179
4.8.1 Alıkonma süresinin belirlenmesi	180
4.8.2 Substrat derişimi etkisi.....	183
4.9 Üretim Verimliliğinin Belirlenmesi	185
4.10 Kimya Mühendisliğinde Modelleme.....	186
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	191
KAYNAKLAR.....	201
EKLER.....	209
EK 1 Asetofenon ve (R,S)-1-feniletanol'e Ait Fiziksel Özellikler	210
EK 2 Asetofenon ve (R,S)-1-feniletanol'e Ait Kalibrasyon Grafikleri.....	212
EK 3 Asetofenon, (R)-1-feniletanol ve (S)-1-feniletanol HPLC Kromatogramı ...	214
EK 4 Enzim Aktivitesi Ölçme	215
EK 5 Gerçek ve Gözlenen Michaelis-Menten Sabitlerinin Hesaplanması.....	218
EK 6 Etkinlik Faktörü, Gözlenen Thiele Modülü ve Etkin Difüzyon Katsayısı Hesaplanması.....	219
EK 7 Reynolds Sayısı Hesabı	220
EK 8 Dolgulu Kolon Biyoreaktörün Model Çözümü (Matlab Çözümü).....	221
ÖZGEÇMİŞ.....	222

SİMGELER DİZİNİ

b	Küvet ışık yolu uzunluğu, cm
c	Dönüşüm
C_b	Taze havuç derişimi, g/L
C_{bl}	Liyofilize havuç derişimi, g/L
C_{bt}	Tutuklanmış havuç derişimi, g/L
C_{btl}	Tutuklanmış liyofilize havuç derişimi, g/L
C_{So}	Başlangıç substrat derişimi, mM
De	Etkin difüzyon katsayısı, cm^2/s
ee	Enantiyomerik aşırılık
K_{ss}	Substrat inhibisyon sabiti, mM
K_M	Michaelis-Menten sabiti, mM
$K_{Mgöz}$	Gözlenen Michaelis-Menten sabiti, mM
M_A	Molekül kütlesi, g/mol
N	Karıştırma hızı, rpm
r	Tepkime hızı, mmol/Lh
r_o	Başlangıç tepkime hızı, mmol/Lh
$r_{göz}$	Gözlenen tepkime hızı, mmol/Lh
r_{maks}	Maksimum tepkime hızı, mmol/Lh
$r_{maksgöz}$	Gözlenen maksimum tepkime hızı, mmol/Lh
t	Zaman, h
T	Sıcaklık, °C
Q	Akış hızı, mL/h
ϵ	Kolon gözenekliliği
V	Absorpsiyon sabiti, $mM^{-1}cm^{-1}$
V_T	Sürekli sistemde sıvı hacmi, mL
$V_Ö$	Toplam hacim, mL
V_k	Örnek hacmi, mL
V_o	Kolon içindeki katı hacmi, mL
v/v	Boş kolon hacmi, mL

KISALTMALAR DİZİNİ

ADH	Alkol dehidrojenaz
CCD	Merkez tümleşik tasarım
DMSO	Dimetil sülfoksit
MTBE	Metil tersiyer bütül eter
HPLC	Yüksek basınç sıvı kromatografisi
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NADPH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
RSM	Responce Surface Methodology (Cevap Yüzey Yöntemi)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Asetofenonun bitki hücreleri biyokatalizörlüğünde indirgenmesi ve kofaktör rejenerasyonu.....	4
Şekil 2.1 Sol el ve onun ayna görüntüsü olan sağ el.....	7
Şekil 2.2 Polarimetrik metotla çevirme açısı tayini	9
Şekil 2.3 2-bromo-2-kloro-1,1,1-trifloroetan (halotan).....	11
Şekil 2.4 2-bütanolün mutlak konfigürasyonu.....	13
Şekil 2.5 Enantiyomerikçe saf bileşikler sentezleme yöntemleri	16
Şekil 2.6 Kiral havuz bileşiklerine örnekler.....	17
Şekil 2.7 Enzim substrat kompleks oluşumu	21
Şekil 2.8 Kiral ilaçlardan İbuprofen ve Talidomit	22
Şekil 2.9 Biyotransformasyon prosesi geliştirme adımları.....	24
Şekil 2.10 Enzimatik olarak katalize edilmiş ve katalize edilmemiş reaksiyonlar	28
Şekil 2.11 Enzim ve substratın üç nokta etkileşimi	30
Şekil 2.12 Enzim substrat ilişkisi	30
Şekil 2.13 Prelog kuralına göre ADH katalizörlüğündeki indirgenme tepkimesi.	32
Şekil 2.14 ADH katalizli asimetrik indirgenme reaksiyonu	32
Şekil 2.15 Alkol dehidrojenaz (ADH) yapısı ve aktif merkezleri.....	33
Şekil 2.16 Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi	37
Şekil 2.17 Yarışmasız substrat inhibisyon için reaksiyon şeması.....	40
Şekil 2.18 Substrat inhibisyonlu ve inhibisyonsuz enzimatik reaksiyonun	40
Şekil 2.19 Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	43
Şekil 2.20 Enzim immobilizasyonunda kullanılan farklı teknikler.....	45
Şekil 2.21 Alginatın kimyasal formülü	49
Şekil 2.22 İç ve dış yayılım dirençleri şematik diyagramı.....	51
Şekil 2.23 Tutuklanmış enzim içindeki bir substrat için kütle denklığı.....	53
Şekil 2.24 Substrat derişiminin radyal yönde değişimi.....	56
Şekil 2.25 Küresel partiküller için, Etkinlik katsayısı-Thiele modülü etkileşimi	57
Şekil 2.26 Homojenizasyon için uygulanan teknikler.....	61
Şekil 2.27 X_1 ve X_2 'nin y 'ye etkisinin cevap yüzey grafiği	66
Şekil 2.28 Karıştırılmalı tank reaktörü	70
Şekil 2.29 Kabarcık kolon ve hava kaldırmalı pnömatik karıştırılmalı reaktörler	71
Şekil 2.30 Membran biyoreaktörler	73
Şekil 2.31 Dolgulu yatak biyoreaktörler	74
Şekil 2.32 Modellemenin faydaları	75
Şekil 2.33 Borusal reaktör.....	76
Şekil 2.34 Kereviz ve havuç tarafından katalizlenmiş enantiyoseçimli indirgenme	80
Şekil 2.35 Ketonların havuç ve kereviz ile biyoindirgenmesi	82
Şekil 2.36 Ketonların ve aldehidlerin biyodönüşümü.....	84
Şekil 2.37 2-kloro florenonun biyokatalizörler ile enantiyoseçimli indirgenmesi.....	85
Şekil 2.38 Florenonların, üzüm biyokatalizörlüğünde biyoindirgenmesi.....	87
Şekil 2.39 2-kloroflorenonun, Elma (<i>Malus pumila Mill.</i>) biyokatalizörü ile	88
Şekil 2.40 Havuç ve şeftali biyokatalizörlüğünde indirgenme	90
Şekil 2.41 Reaksiyon süresi, pH, başlangıç substrat derişimi etkisi	92
Şekil 2.42 Biyokatalizör derişimi, kosubstrat derişimi ve tekrar kullanım sayısı.....	93
Şekil 2.43 Havuç bitki hücreleri ile tetrahydropyranın indirgenmesi	94

Şekil 2.44 Asetofenonun bezelye biyokatalizörlüğünde indirgenmesi	95
Şekil 2.45 Ketonların <i>adzuki fasulyesi</i> biyokatalizörlüğünde indirgenmesi	97
Şekil 2.46 Adzuki fasulyesinden yeni biyokatalizörlerin hazırlanması	97
Şekil 2.47 Asetofenonun maya biyokatalizörü ile (R)-1-feniletanole indirgenmesi.....	100
Şekil 2.48 Tutuklanmış ve serbest hücreler için ketonların asimetrik indirgenmesi	101
Şekil 2.49 Shallow yatak reaktörün boyutları	102
Şekil 2.50 1- Feniletanol üretimi üzerine substrat derişiminin etkisi.....	103
Şekil 2.51 4-bromoasetofenonun indirgenmesi	104
Şekil 2.52 Asetonaftonun, S-(1)-(Naftiletanole) biyokatalitik indirgenmesi.....	107
Şekil 2.53 Dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine reaksiyon sıcaklığı etkisi	108
Şekil 2.54 Dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine hücre derişimi etkisi.....	109
Şekil 2.55 Serbest ve tutuklanmış hücrelerle tekrar kullanılabilirlik	111
Şekil 3.1 Asetofenonun bitki hücreleri biyokatalizörlüğünde indirgenmesi.....	113
Şekil 3.2 Tutuklama yöntemi deney sistemi	117
Şekil 3.3 Sürekli sistem deney düzeneği.....	121
Şekil 3.4 HPLC sistemi	122
Şekil 4.1 <i>D.carota</i> (Havuç) biyokatalizörü için zamana karşı absorbands değişimi	124
Şekil 4.2 Farklı biyokatalizörlerin ADH aktivitesi	125
Şekil 4.3 Taze havuç hücreleri için biyoindirgemeye substrat derişimi etkisi.....	126
Şekil 4.4 Substrat derişiminin dönüşüm ve ürün derişimi üzerine etkisi.....	127
Şekil 4.5 Taze havuç hücreleri için biyoindirgemeye sıcaklık etkisi.....	128
Şekil 4.6 Taze havuç hücreleri için biyoindirgemeye biyokatalizör derişimi etkisi	129
Şekil 4.7 Taze havuç hücreleri için biyoindirgemeye pH etkisi	130
Şekil 4.8 Taze havuç hücreleri için biyoindirgemeye tepkime süre etkisi.....	131
Şekil 4.9 Farklı biyokatalizörlerin biyoindirgemeye etkisi.....	132
Şekil 4.10 Taze havuç hücrelerinin tekrar kullanım sayısı	133
Şekil 4.11 Liyofilize havuç hücreleri için biyoindirgemeye substrat derişimi etkisi....	134
Şekil 4.12 Liyofilize havuç biyokatalizörü için biyoindirgemeye sıcaklık etkisi.....	135
Şekil 4.13 Liyofilize havuç hücreleri için biyoindirgemeye pH etkisi	136
Şekil 4.14 Liyofilize havuç hücreleri için biyoindirgemeye süre etkisi.....	137
Şekil 4.15 Kofaktör rejenerasyonu etkisi	138
Şekil 4.16 Glikozun etkisi	139
Şekil 4.17 Glikoz ilavesiz tepkime ortamı	139
Şekil 4.18 Tutuklanmış taze havuç hücreleri ile pellet çapı etkisi.....	141
Şekil 4.19 Tutuklanmış taze havuç hücreleri ile aljinat derişimi etkisi	142
Şekil 4.20 Tutuklanmış taze havuç hücreleri için substrat derişimi etkisi.....	143
Şekil 4.21 Taze havuç, liyofilize havuç ve tutuklanmış taze havuç için %ee-%c	144
Şekil 4.22 Tutuklanmış taze havuç biyokatalizörü için sıcaklık etkisi	145
Şekil 4.23 Tutuklanmış taze havuç hücreleri için biyoindirgemeye pH etkisi	146
Şekil 4.24 Tutuklanmış taze havuç hücreleri için biyoindirgemeye süre etkisi.....	147
Şekil 4.25 Tutuklanmış taze havuç hücrelerinin tekrar kullanım sayısı	148
Şekil 4.26 Tutuklanmış taze havuç hücreleri için biyoindirgemeye pH etkisi	149
Şekil 4.27 Tutuklanmış taze havuç hücrelerinin tekrar kullanım sayısı	150
Şekil 4.28 Tutuklanmış liyofilize havuç hücreleri için substrat derişimietkisi.....	151
Şekil 4.29 Tutuklanmış liyofilize havuç hücreleri için biyoindirgemeye süre etkisi....	152
Şekil 4.30 Tutuklanmış liyofilize havuç hücreleri için biyoindirgemeye pH etkisi	153
Şekil 4.31 Tutuklanmış liyofilize havuç hücreleri için sıcaklık etkisi.....	154

Şekil 4.32 Taze havuç, liyofilize havuç, tutuklanmış taze ve tutuklanmış liyofilize havuç için %ee-%c.	155
Şekil 4.33 Ürün derişimine, (C_{SO}) ve (t) etkisinin üç etkisinin üç boyutlu grafiği	158
Şekil 4.34 Ürün derişimine, (C_b) ve (C_{SO}) etkisinin üç boyutlu grafiği	159
Şekil 4.35 Ürün derişimine, (C_b) ve (t) etkisinin üç boyutlu grafiği	160
Şekil 4.36 Ürün derişimine, (t) ve (N) etkisinin üç boyutlu grafiği	160
Şekil 4.37 Ürün derişimine, (C_{SO}) ve (N) etkisinin üç boyutlu grafiği	161
Şekil 4.38 Model ve gerçek değerler arasındaki ilişki	162
Şekil 4.39 Substrat derişimi ile (S)-1-feniletanol derişiminin değişimi	163
Şekil 4.40 Başlangıç substrat derişimine karşı başlangıç tepkime hızı grafiği	164
Şekil 4.41 $1/C_{so}-1/r_o$ grafiği	165
Şekil 4.42 Substrat derişimi ile (S)-1-feniletanol derişiminin değişimi	167
Şekil 4.43 Liyofilize havuç için başlangıç substrat derişimine ve tepkime hızı grafiği	168
Şekil 4.44 Liyofilize havuç için Lineweaver-Burk ile $1/C_{so}-1/r_o$ grafiği	169
Şekil 4.45 Karıştırma hızının başlangıç tepkime hızına etkisi	170
Şekil 4.46 Karıştırma hızının başlangıç tepkime hızına etkisi	171
Şekil 4.47 Serbest ve tutuklanmış hücre ile (S)-1-feniletanol derişiminin değişimi	172
Şekil 4.48 Serbest ve tutuklanmış hücre ile (S)-1-feniletanol derişiminin değişimi	172
Şekil 4.49 Serbest ve tutuklanmış hücre ile (S)-1-feniletanol derişiminin değişimi	173
Şekil 4.50 Serbest ve tutuklanmış hücre ile (S)-1-feniletanol derişiminin değişimi	176
Şekil 4.51 Serbest biyokatalizör ile Lineweaver-Burk grafiği	176
Şekil 4.52 2mm çapında tutuklanmış hücre ile Lineweaver-Burk grafiği	177
Şekil 4.53 3mm çapında tutuklanmış hücre ile Lineweaver-Burk grafiği	178
Şekil 4.54 Etkinlik faktörü (η) ile Thiele modülünün (Φ) değişimi	180
Şekil 4.55 7 h kalma süresinde kolon çıkış akımının zamanla değişimi	181
Şekil 4.56 4 h kalma süresinde kolon çıkış akımının zamanla değişimi	181
Şekil 4.57 2 h kalma süresinde kolon çıkış akımının zamanla değişimi	182
Şekil 4.58 Yatışkın halde farklı kalma sürelerinde % dönüşüm ve % ee değerleri	183
Şekil 4.59 Kalma süresinin verimlilik ve (S)-1-feniletanol derişimine etkisi	184
Şekil 4.60 Substrat derişiminin zamanla ee ve dönüşüm üzerine etkisi	185
Şekil 4.61 Substrat derişiminin biyoindirgemeye etkisi	186
Şekil 4.62 Farklı başlangıç substrat derişimlerinde (z)-(%c) için deneysel sonuçlar ...	187
Şekil 4.63 1 mM başlangıç derişiminde model ve deney karşılaştırılması	188
Şekil 4.64 2 mM başlangıç derişiminde model ve deney karşılaştırılması	189
Şekil 4.65 4 mM başlangıç derişiminde model ve deney karşılaştırılması	190

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması	27
Çizelge 2.2 Enzim tutuklamada kullanılan taşıyıcılar.....	48
Çizelge 2.3 Sulu çözeltilerdeki jellerin içinde çözünen maddelerin etkin difüzyon hızları	60
Çizelge 2.4 1-indanones biyoindirgenmesi	79
Çizelge 2.5 2 Terpenoid ketonların biyoindirgenmesi	79
Çizelge 2.6 Tetralon ketonların biyoindirgenmesi	79
Çizelge 2.7 Kereviz ve havuç tarafından katalizlenmiş % c ve % ee değerleri	81
Çizelge 2.8 Kereviz ve havuç tarafından katalizlenmiş sıcaklığa bağlı % c değerleri ..	82
Çizelge 2.9 Kereviz ve havuç tarafından katalizlenmiş % c ve % ee değerleri	83
Çizelge 2.10 <i>Manihot dulcis-escilanta</i> ve farklı bitkiler ile elde edilen % ürün verimi ..	84
Çizelge 2.11 Her iki bitki türü için % dönüşüm ve % ee değerleri.....	85
Çizelge 2.12 2-kloro florenonun biyokatalizörler ile enantiyoseçimli indirgenmesi.....	86
Çizelge 2.13 Elma biyokatalizörü ile beş farklı florenonun	87
Çizelge 2.14 Polisiklik aromatik ketonların, bitki biyokatalizörlüğünde indirgenmesi ..	89
Çizelge 2.15 Farklı ortamlarda propiyonik asit etil esterinin indirgenmesi	91
Çizelge 2.16 Havuç hücreleri ile tetrahydropyranın enantiyoseçimli indirgenmesi	94
Çizelge 2.17 Prokiral substratların, bezelye biyokatalizörü ile indirgenmesi.....	96
Çizelge 2.18 Adzuki fasulyesi biyokatalizörü için, farklı derişimler.....	98
Çizelge 2.19 Aromatik ketonların ve keto esterlerin, immobilize havuç hücreleri ile enantiyoseçimli indirgenmesi	99
Çizelge 2.20 4-bromoasetofenonun indirgenmesi	104
Çizelge 2.21 4-bromoasetofenonun indirgenmesi üzerine reaksiyon etkisi	105
Çizelge 2.22 4-bromoasetofenonun, <i>G. candidum</i> ile (R)-4-bromofeniletanole	105
Çizelge 2.23 4-bromoasetofenonun, <i>R. Rubra</i> ile (R)-4-bromofeniletanole indirgenmesi.....	106
Çizelge 2.24 Organik çözücü varlığında biyotransformasyon (%10 (v/v))	110
Çizelge 3.1 ADH deneyi analizleri sırasında kullanılan örnek ve kör çözeltileri	113
Çizelge 3.2 CCD için kullanılan bağımsız değişkenler	119
Çizelge 3.3 CCD tasarım için deneysel matris.....	120

Çizelge 3.4 HPLC analiz koşulları.....	123
Çizelge 4.1 Bağımsız değişkenler için deney matrisi ve tahminlenen cevap değerleri.....	156
Çizelge 4.2 CCD için ANOVA testi	157
Çizelge 4.3 Model denklemin çözümü sonucunda elde edilen optimum koşullar.....	161
Çizelge 4.4 Başlangıç tepkime hızının, başlangıç substrat derişimi ile değişimi	163
Çizelge 4.5 Başlangıç tepkime hızı- başlangıç substrat derişimi değişimi	165
Çizelge 4.6 Liyofilize havuç ile başlangıç tepkime hızı- başlangıç substrat derişimi.....	167
Çizelge 4.7 Taze ve liyofilize havuç için K_M ve r_{maks} değerleri.....	168
Çizelge 4.8 Serbest ve tutuklanmış biyokatalizörlerin başlangıç hızları	169
Çizelge 4.9 Serbest ve tutuklanmış hücreler için toplu sonuçlar	175
Çizelge 4.10 Etkinlik katsayısı, Thiele modülü ve etkin difüzyon katsayısı değerleri	177
Çizelge 4.11 Sürekli ve kesikli sistemde üretim verimliliği	178
Çizelge 5.1 Taze ve liyofilize havuç için K_M ve r_{maks} değerleri.....	196
Çizelge 5.2 Serbest ve tutuklanmış hücreler için toplu sonuçlar	197
Çizelge 5.3 Pellet çapı, etkinlik katsayısı ve Thiele modülü toplu sonuçlar.....	197

1. GİRİŞ

Biyotransformasyon, enzimler veya biyolojik sistemler tarafından bölgesel ve stereo seçimli olarak katalizlenen kimyasal dönüşümler olarak tanımlanabilir (Ji Hua vd. 2010).

Günümüzde önemi giderek artan biyoteknolojik çalışmaların çok önemli bir alanını oluşturan biyotransformasyon ilaç etken maddeleri, koku maddeleri, gıda katkı maddesi, antibiyotik ve amino asit üretimi gibi pek çok kullanım alanı dışında toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi çevre sorunlarının giderilmesi amacıyla da uygulanabilmektedir (Telefoncu 1995).

Biyotransformasyon tepkimeleri sayesinde günümüzde optikçe saf bileşiklerin üretimi, rasemik karışımların ayrılması, benzer reaktif gruplar arasındaki fonksiyonel grup seçimi, seçimli olarak yapıya fonksiyonel grup katılması gibi işlemler kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir. Biyotransformasyonla kolaylıkla gerçekleştirilen bu işlemleri kimyasal yöntemlerle gerçekleştirmek oldukça güçtür (Gülsoy 2000).

Kimyasal olarak gerçekleştirilen reaksiyonlar birkaç adımda oluşur ve bu esnada çevre için zararlı yan tepkimeler meydana gelir. Enzim ve substratların ara tepkimeleriyle aktivasyon enerjisi oldukça düşürülür. Bu sayede biyotransformasyon tepkimeleri, 30-40 °C sıcaklıkta, nötrale yakın bir pH ve normal basınç altında gerçekleşebilir. Bu nedenle biyokatalitik tepkimeler genellikle ılımlı tepkime koşullarında gerçekleşen güvenli tepkimelerdir (Nakamura vd. 2003).

Biyotransformasyon tepkimeleri tüm hücre ve saf enzim sistemleri olmak üzere iki yöntem kullanılarak gerçekleştirilebilir. Tüm hücre kullanıldığında metabolik yol izlenebildiğinden dolayı, kofaktör rejenerasyonu hücre içinde yapılabilir. Ayrıca, enzim saflaştırılma işleminin zaman ve kaynak yönünden pahalı olması nedeniyle biyokatalitik reaksiyonların, tüm hücre kullanılarak gerçekleştirilmesi tercih edilir (Faber 2003).

Son yıllarda, biyokatalizör olarak bitki hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen biyokatalitik reaksiyonlar, bitkilerin sentezlenen kimyasal maddelere göre yan

etkilerinin daha az olması ve maliyetlerinin düşük olması nedeni ile dikkat çekmektedir (Giri vd. 2001).

Biyokatalitik reaksiyonlar enzim kaynağı olarak sebzeler veya meyveler kullanılarak, ketonların biyoindirgenmesi, ester hidrolizi, oksidasyon reaksiyonları gibi uygulama alanlarına sahiptir. Bu uygulamalar arasından, en fazla ilgi çeken, ketonların optikçe aktif ürün eldesi için, sebze ve meyveler kullanılarak biyoindirgenmesidir (Leandro vd. 2005).

Optikçe aktif ürünlere ilginin başlıca nedeni enantiyomerlerin farklı biyolojik aktiviteler sergilemesidir. İlaçlarda enantiyomerlerden biri istenen aktiviteye sahipken, diğer enantiyomer farklı ve çoğu zaman zararlı farmakolojik özelliklere sahiptir (Ong vd. 2006).

Enzimler ve diğer biyolojik katalizörler asimetric yapıya sahip moleküllerdir. Bu özellikleri doğada seçici ve hedefe özgün biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesini sağlamaktadır (Csuk vd.1990)

Asimetric yani kiral yapılar, asimetric sentez ve rasemik karışımların ayrıştırılması yöntemleri ile biyokatalitik olarak sentezlenebilirler. Enzimler bu sentez metodlarında etkinlikle kullanılabilirler (Collins vd. 1997).

Optik olarak saf bileşikler elde etmek için diğer yollarda önemli ilerlemeler olmasına rağmen diastereomerik kristalizasyon ile rasematların klasik rezolüsyonu hala endüstride kullanılan en önemli yöntemlerden biridir. Ancak, bu yöntemde maksimum teorik verimi % 50'dir (Jacques vd. 1981).

Enantiyomerik olarak saf yapı taşlarının elde edilmesinde kullanılan, prokiral bir bileşikten başlayarak asimetric sentez yönteminde ise, teorik olarak, tüm kiral olmayan başlangıç maddelerini enantiyomerik olarak saf ürünlere dönüştürmek mümkündür. (Demirtaş 2009).

Kiral alkollerin asimetrik sentezi, zirai kimyasallar, ilaçlar, tatlandırıcı ve renklendirici üretiminde geniş uygulama alanları bulmuştur. Bu alkoller prokiral ketonların enantiyoseçimli olarak indirgenmesi ile elde edilebilirler (Wanda vd. 2004).

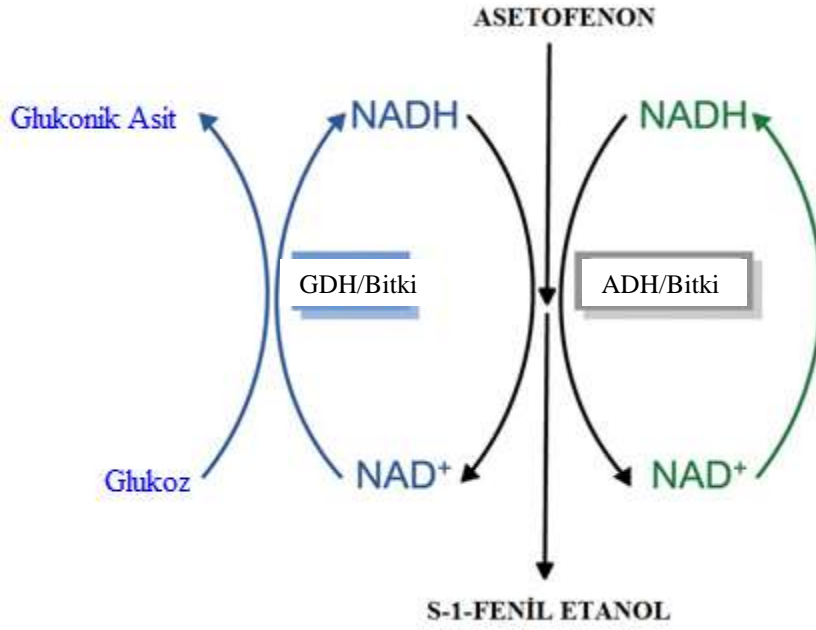
Enzim katalizli tepkimelerde enantiyomerik aşırılık (ee) ve enantiyomerik oran (E) olmak üzere iki önemli kavram vardır. Herhangi bir bileşiğin enantiyomerik saflığı enantiyomerik aşırılık terimi ile ifade edilir. Enantiyomerik oran değeri (E) ise enantiyoseçimliliği ifade eder (Ghanem vd. 2004).

Enantiyomerik saflıktaki kiral alkoller pek çok farmakolojik ürünün çıkış maddesidir. Optik saflıktaki 1-feniletanol, değerli kimyasalların (fine chemicals) üretiminde kiral yapıtaşı olarak kullanılmaktadır (Suan vd. 2004).

İlaç sanayiinde önemli bir ara ürün olan ve ketonların biyoindirgenmesi ile elde edilen optik olarak saf kiral alkollerin üretimi için kullanılan asimetrik sentez, son 10 yılda önemli bir sentez yöntemi haline gelmiştir. Biyoindirgenme alkol dehidrojenaz (ADH) enzimi tarafından katalizlenir (Wolfgang vd. 2011).

Prokiral bir keton olan asetofenon, 1-feniletanolün her iki enantiyomerini oluşturabildiği için biyoindirgenme tepkimelerinde önemli bir model substrat olarak kabul edilir (Wanda vd. 2004).

Biyokatalitik üretim, kimyasal yolla yapılan üretime göre daha avantajlı olduğundan bu tez kapsamında, model substrat olarak seçilen asetofenonun, asimetrik indirgenmesiyle optikçe saf 1-feniletanol üretimi, karbonil grubunu indirgeyebilmek için ADH enzim kaynağı olarak çeşitli meyve ve sebzeler kullanılarak, biyokatalitik olarak araştırılmıştır. İzole enzim saflaştırmanın maliyetinin yüksek olmasından dolayı ve kofaktör rejenerasyonuna gerek duyulmaması sebebiyle biyokatalizör olarak izole enzimler yerine tüm hücre kullanılmıştır. Bitkilerin enzim kaynağı olarak kullanımı özellikle pahalı olan kofaktörlerin dışarıdan eklenmesini gerektirmediğinden avantajlıdır. Asetofenonun ADH biyokatalizörlüğünde indirgenmesi için glukoz ve GDH enziminin kofaktör rejenerasyonu olarak kullanımı şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1 Asetofenonun bitki hücreleri biyokatalizörlüğünde indirgenmesi ve kofaktör rejenerasyonu

Oksidoredüktaz olan ADH enzimi, genellikle stokiometrik oranda pahalı kofaktörlere ihtiyaç duyar. En yaygın olarak kullanılan kofaktörler NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺, FADH/FAD kofaktörleridir. Çoğunun pahalı olması nedeniyle endüstriyel bir prosesin maliyeti, kofaktör rejenerasyon sistemi gerektirir. İndirgenme reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi için hidrojen kaynakları gereklidir. Biyokatalitik indirgenme için etanol, 2-propanol, glukoz ve formik asit kaynak olarak kullanılabilir. Kofaktör geri dönüşüm problemini çözmek için ise, katalitik hidrojen transferi gerçekleştirilmelidir. Bitki hücrelerinin birçok türünde kofaktör rejenerasyon sistemi mevcuttur ve bitki hücreleri asimetrik indirgenme reaksiyonları için potansiyel biyokatalizörlerdir (Wolfgang vd. 2011).

Bu doktora tezi kapsamında, ilaç sanayi için önemli girdi olan bir kiral alkolü üretmek amacıyla kesikli karıştırmalı biyoreaktörde karbonil grubunu indirgeyebilmesi için ADH enzim kaynağı olarak çeşitli meyve ve sebzeler kullanılmıştır. En yüksek aktiviteye sahip olan uygun bitkinin seçimi için, farklı bitkilerin (havuç, patates, üzüm, turp) ADH enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Daha sonra, biyokatalizör olarak en yüksek ADH aktivitesine sahip olan havuç kullanılarak, enantiyomerik saflıkta (S)-1-feniletanol üretimine substrat derişimi ve sıcaklık, tepkime süresi, tepkime pH'ı ve

hücre derişiminin etkileri araştırılmıştır. Taze havuç dondurularak kurutulmuş ve liyofilize havuç elde edilmiştir. Liyofilize havuç biyokatalizörü için substrat derişimi, sıcaklık, tepkime süresi, tepkime pH'ı gibi işletme parametrelerini optimize etmek için Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) kullanılmıştır. Daha sonra tutuklanmış taze ve tutuklanmış liyofilize havuç biyokatalizörleri ile kesikli sistemde işletme parametreleri incelenmiştir. Ayrıca, tepkime kinetiği ve dolgulu kolon (tutuklanmış taze havuç hücresi içeren) biyoreaktörde işletme parametrelerinin etkisi incelenerek, biyoreaktörün matematiksel modellenmesi tanımlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Sterokimya

Biz üç boyutlu bir dünyada yaşıyoruz. Gerçekten de üç boyutluluğun sözlükteki tanımı “yaşamdaki gibi” (göründüğü gibi) dir. Çevremizde özellikle de canlı organizmalarda cereyan eden kimyasal değişimler moleküller arası üç boyutlu ilişkilerden etkilenirler. Atomların ve moleküllerin uzaysal düzenlemeleri ile ilgili çalışmalar stereokimya olarak bilinir (Atkins 1999).

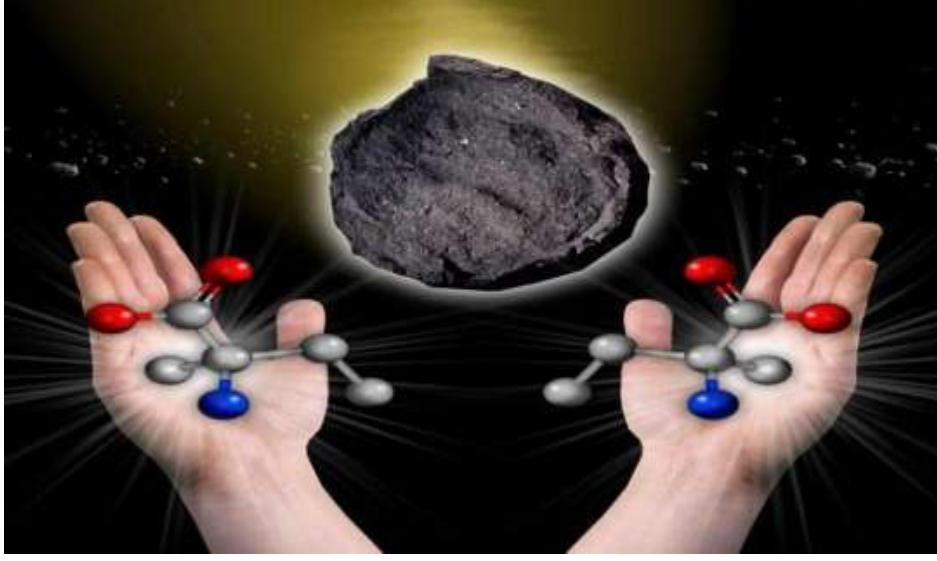
Stereoizomerler, aynı sırayla birbirine bağlanmış aynı atomlardan oluşan, fakat değişik üç boyutlu yapıları olan bileşiklerdir. Enantiyomerlerin saf çözeltileri düzlem polarize ışığı aynı derecede farklı yönlerde çevirirler. Bu nedenle, stereoizomerler aynı zamanda optik izomerler olarak da adlandırılır. Stereoizomerler;

- Optik izomerler (Enantiyomerler)
- Geometrik izomerler

olarak gruplandırılırlar (Yüksekdanacı 2010).

2.2 Ayna Görüntüleri ve Kirallik

Ayna görüntüsü aynada ne gözlediğinizdir. Kirallik ise ayna görüntüsü üst üste çakışmayan nesnelere denir. Bir nesne veya molekül ile onun ayna görüntüsü olan ve üst üste çakışmayan stereoizomerlere *enantiyomerler* denir.



Şekil 2.1 Sol el ve onun ayna görüntüsü olan sağ el

Genel olarak w, x,y ve z gibi dört farklı atom ya da grubun bağlı olduğu karbon içeren moleküller kiral moleküller olarak adlandırılırlar ve bu karbon merkezi de stereojenik merkez olarak tanımlanır. Bir molekülde bir stereojenik merkez varsa bu molekül kiraldır.

2.3 Enantiyomerlerin Fiziksel Özellikleri

Yoğunluk, erime noktası, kaynama noktası gibi hemen her zaman konu edilen fiziksel özellikler, bir kiral bileşiğin her iki enantiyomeri için de aynıdır. Bununla beraber enantiyomerler, üç boyutlu uzayda atomların düzenlenmesine bağlı olarak farklı özellikler gösterebilir. Örneğin karvon (carvone) nun enantiyomerlerini ele alalım. (R)-(-)-Karvon nane yağının ana bileşiği iken enantiyomeri olan S-(+)- karvon ise kimyon kökü yağının ana bileşiğidir. Karvonun bu iki enantiyomerinin her birinin kendi karakteristik kokusu vardır. (R) ve (S)-Karvon arasındaki koku farklılığı onların burundaki alıcı sinir bölgelerine karşı farklı davranmalarından kaynaklanır. Uçucu moleküllerin, bu molekülleri barındıracak uygun şekle sahip alıcı sinir bölgelerini işgal ettiklerine inanılır. Bu alıcı sinirlerin kendileri kiral olup sonuçta bir enantiyomer, alıcı sinirlerin bir bölgesi için uygun olurken diğer enantiyomer diğer bir bölge için uygun olur.

2.3.1 Kiral tanıma terimi

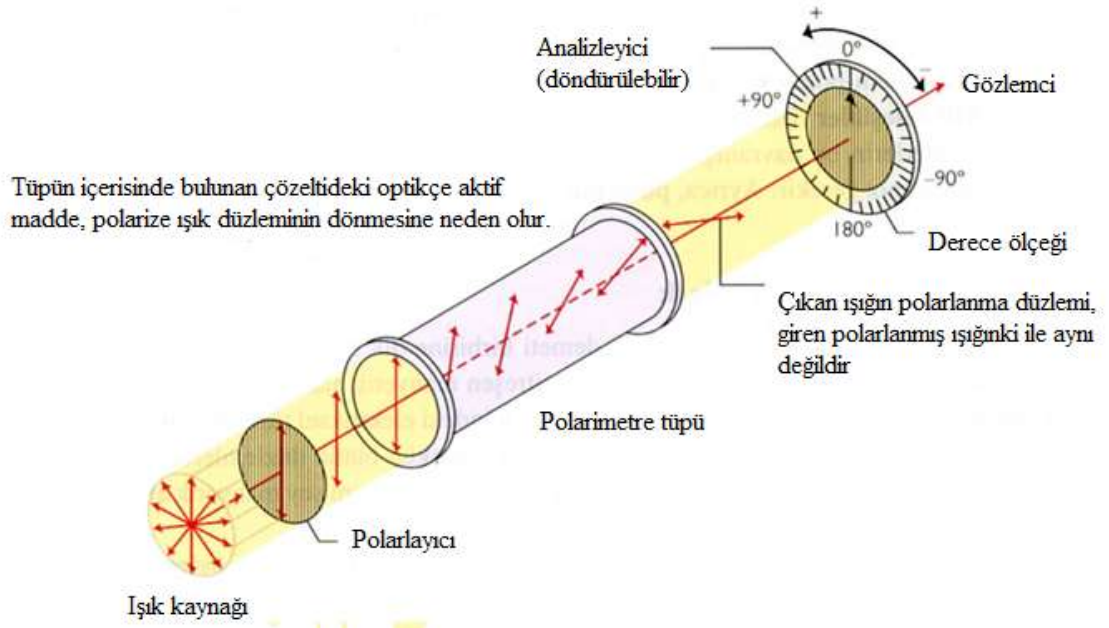
Bazı kiral alıcıların veya kimyasal bileşiklerin, bir kiral molekülün enantiyomerlerinden biri ile seçici olarak etkileştiği bir işlemdir. Özellikle bazı biyolojik etkileşmelerde kiral tanıma çok yüksek bir seviyede gözlenir. Örneğin (-)-nikotin (+)-nikotinden daha çok zehirlidir, (+)-adrenalin kan damarlarını sıkıştırmada (-)-adrenalinden daha aktiftir. (-)-Tiroksin tiroid bezleri tarafından üretilen ve metabolizmayı hızlandıracak heyecanlanmaya ve kilo kaybına neden olan bir hormondur. Onun enantiyomeri olan (+)-Tiroksinde bu özelliklerin hiçbiri yoktur.

2.4 Enantiyomerlerin Saflığını Belirleme Yöntemleri

2.4.1 Kiral moleküllerde optikçe aktiflik

Optikçe aktiflik, bir molekülün; polarize olmuş ışığın polarizasyon düzlemini çevirme yeteneğidir. Kiral bir bileşiğin her bir enantiyomeri optikçe aktiflik gösterir ve bunların optikçe aktif olduğu söylenir.

Görünür ışık elektromanyetik ışımanın bir şeklidir. Tüm elektromanyetik ışımalarda olduğu gibi bir ışık demeti dalgasından oluşur. Işık demetini polarlayıcı (polarizör) denen bir alet içerisinden geçirerek, geçen ışık dalgalarının yalnızca bir düzlem üzerinde titreşmesi sağlanabilir ki, bu da düzlem-polarize ışık olarak adlandırılır.



Şekil 2.2 Polarimetrik metotla çevirme açısı tayini

Kiral bir maddenin bir enantiyomerini içeren bir çözelti içerisinde düzlem polarize olmuş bir ışık demeti geçirildiğinde bu ışığın polarizasyon düzleminin bir α (alfa) açısı kadar sağa yada sola çevrildiği gözlenir. Optikçe aktiflikten kastedilen bu çevrilmedir. Çevirme açısı, gözlenen optik çevrilmedir ve analizörden ikinci bir polarlayıcı içerisinde geçen polarize ışığın görüntülenmesi ile ölçülür. Optikçe aktifliği ölçmek için kullanılan cihaza polarimetre denir.

Optikçe aktiflik erime noktası, kaynama noktası ve yoğunluk gibi fiziksel bir özelliktir. Bir maddenin optikçe aktifliği özgül çevirme olarak ifade edilir ve (α) sembolü ile verilir. Özgül çevirme (α) , gözlenen α çevrilmesinden hesaplanabilir;

$$(\alpha) = \frac{100 \alpha}{c l} \quad (2.1)$$

Ancak, pratikte karışıklığa yol açtığından dolayı optik saflığın belirlenmesinde bu metodun kullanımı tercih edilmemektedir. Bu sebeple enantiyomerik saflık, enantiyomerik asırlık (ee) denen kesin bir terimle ifade edilmesi daha uygun bulunmuştur. Enantiyoseçimliliğin derecesi, enantiyomerik asırlık (e.e.) olarak ifade

edilir. Burada enantiyomerlerin oranı yüzde olarak ifade edilir. Enantiyomerik oran yerine bütün durumlarda enantiyomerik aşırılık terimini kullanmanın nedeni doğrudan doğruya optikçe saflığı ifade etmesidir. %100 e.e.'li bir madde enantiyomerik olarak saf bileşiktir. Bir bileşiğin enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm yüzdesi aşağıdaki denklemler yardımıyla hesaplanabilir (Ghanem 2004).

$$C_S > C_R;$$

Enantiyomerik aşırılık yüzdesi;

$$\% ee = \frac{C_S - C_R}{C_S + C_R} \times 100 \quad (2.2)$$

Dönüşüm yüzdesi;

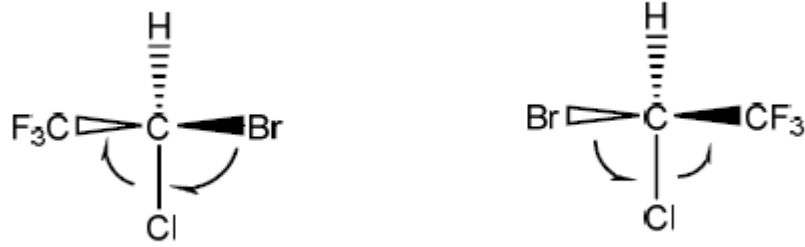
$$\% c = \frac{C_0 - C_S}{C_0} \times 100 \quad (2.3)$$

Kiral bir bileşiğin eşit miktardaki iki enantiyomerinin bir karışımı herhangi bir optik çevirme göstermez $\alpha=0$. Çünkü her bir enantiyomerin pozitif ve negatif çevirmeleri birbirini yok eder. Bir kiral bileşiğin enantiyomerlerinden eşit miktarda içeren bir karışıma rasemik karışım denir ve herhangi bir optikçe aktiflik göstermez. Akiral bileşiklerde optikçe aktif değildirler. Çünkü optikçe aktiflik yalnızca kiral bileşiklerin sergilediği fiziksel bir özelliktir. Bir maddenin optikçe aktiflik gösterebilmesi için madde kiral olmalı ve enantiyomerlerden birinin miktarı diğerinden fazla olmalıdır (Atkins 1999).

2.4.1.1 Mutlak konfigürasyona ait r-s tanımlama sistemi

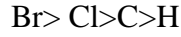
Mutlak konfigürasyonu belirlemek için kullanılan sistem ilk defa 1956 yılında iki İngiliz kimyacı R.S. Cahn ve Sir Christopher Ingold tarafından İsviçreli meslektaşları Vladimir Prelog'un iş birliği ile geliştirilmiştir. Bu geliştirilen sistemin en önemli özelliği genel anlamda moleküldeki stereojenik karbona bağlı olan atomların, atom numaralarına göre öncelikli sıralanmasıdır. Örneğin hastanelerde anestezi maddesi

olarak kullanılan 2-bromo-2kloro-1,1,1-trifloroetanın (halotan) her bir enantiyomerinin mutlak konfigürasyonu aşağıdaki kurallara göre belirlenir:



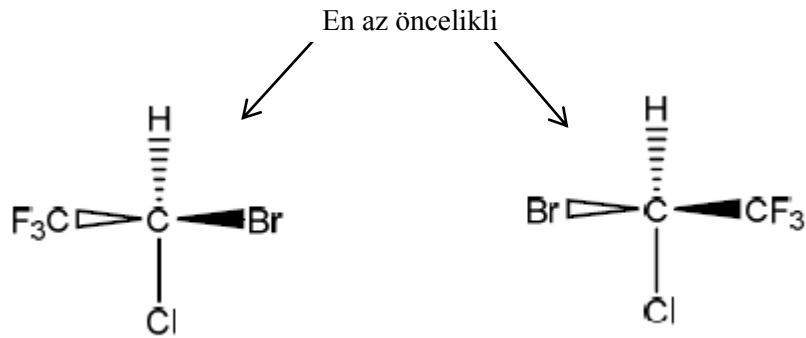
Şekil 2.3 2-bromo-2-kloro-1,1,1-trifloroetan (halotan)

1. Stereojenik karbona bağlı atomlar belirlenir ve azalan atom numarasına göre sıralanır. Bu sıralama aynı zamanda stereojenik karbona bağlı atom ve birden fazla atomdan oluşan grupların öncelikli sırasını belirler. Örnek moleküldeki stereojenik karbona bağlı atom ya da gruplar H, Cl, Br ve CF₃ olup bunlar azalan atom sırasına göre sıralanır.

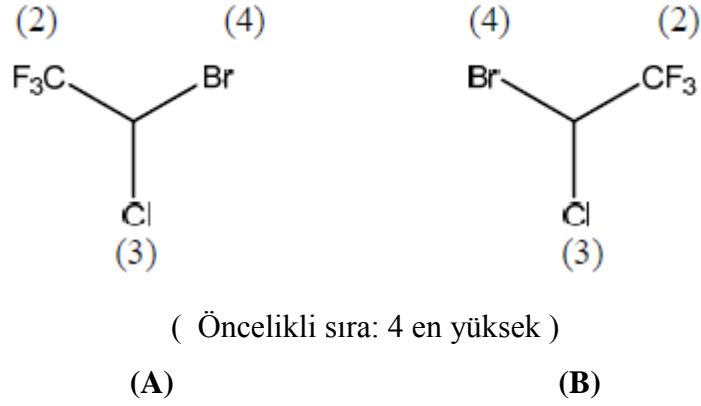


En öncelikli En az öncelikli

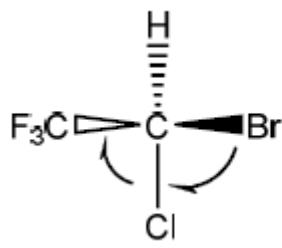
2. En az öncelikli atom ya da grup sayfa düzleminin arkasında kalacak şekilde molekül yönlendirilir. Örnekte hidrojen en az öncelikli olup molekül doğru yönelimdedir.



3. Daha sonra, moleküldeki kalan diğer üç atom ya da grup moleküle aynı yönden, yani en küçük grup arkada kalacak şekilde önden bakıldığında nasıl görünüyorlarsa o şekilde çizilir.



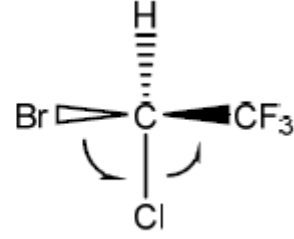
4. En öncelikli olan gruptan azalan öncelik sırasına göre ($\text{Br} > \text{Cl} > \text{CF}_3$) gidildiğinde, A da olduğu gibi saat ibresinin yönünde gidilmiş ise molekülün mutlak konfigürasyonu R (Latince rectus ‘sağ’) olarak; B de olduğu gibi saat ibresinin tersi yönünde gidildi ise molekülün mutlak konfigürasyonu S (Latince sinister ‘sol’) olarak tanımlanır.



Saat yönü (R)

A

(R)-2-Bromo-2-kloro-
1,1,1-trifloroetan



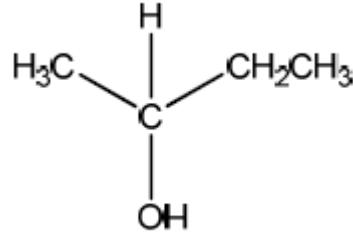
Saat yönünün tersi (S)

B

(R)-2-Bromo-2-kloro-
1,1,1-trifloroetan

Halotanın A ve B olarak gösterilen iki enantiyomerini ele alalım. Bunlardan biri R diğeri S konfigürasyonundadır. Genel bir kural olarak; mutlak konfigürasyonu R olan bir maddenin enantiyomeri S, mutlak konfigürasyonu S olan bir maddenin enantiyomeri ise R konfigürasyonuna sahiptir.

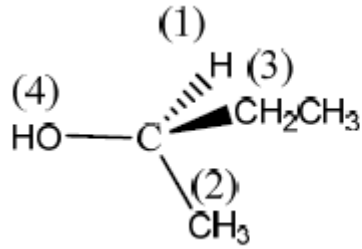
2-bütanolün mutlak konfigürasyonuna bakıldığında bu molekülde stereojenik merkeze bağlı atom ya da gruplar H, OH, CH_3 ve CH_2CH_3 olup en yüksek ve en düşük öncelikli atom ya da gruplar sırası OH ve H'dir.



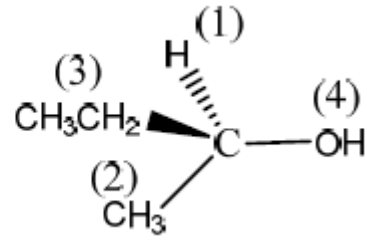
Şekil 2.4 2-bütanolün mutlak konfigürasyonu

Diğer taraftan metil ve etil gruplarının her ikisinde karbon atomları ile stereojenik merkeze bağlanmışlardır. Bu durumda grupların atomları, stereojenik merkeze bağlandıkları noktadan itibaren tek tek değerlendirilir ve farklılığın çıktığı noktada öncelik tespit edilir. Böylece $-\text{CH}_2\text{CH}_3[-\text{C}(\text{C},\text{H},\text{H})]$, $\text{CH}_3[-\text{C}(\text{H},\text{H},\text{H})]$ den daha önceliklidir. Yani etil grubunda stereojenik merkeze bağlı karbon atomuna bir karbon ve iki hidrojen bağlı iken; metil grubunda stereojenik merkeze bağlı karbon atomuna üç hidrojen bağlıdır.

Bu durumda 2-bütanolün enantiyomerlerinin mutlak konfigürasyonu aşağıdaki gibidir.

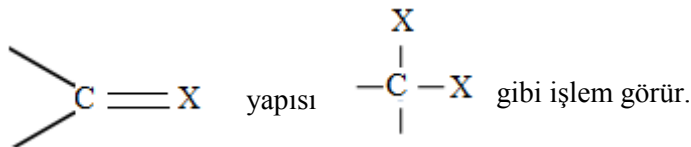


(S)-(+)-2-Bütanol

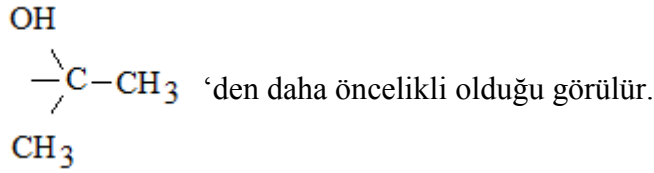
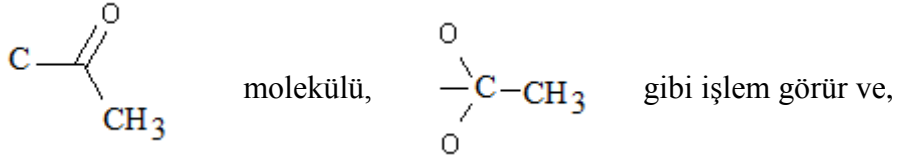


(R)-(-)-2-Bütanol

Çoklu bağ içeren gruplarda öncelikli grup tespiti yapılırken çoklu bağlar aşağıda gösterildiği şekilde tekli bağa indirgenir.



Bu yöntem sadece öncelikli sıra tespitinde uygulanan bir yöntemdir. Örneğin bir karbonil grubu, bir alkol grubundan daha önceliklidir.



Bir kiral molekülün mutlak konfigürasyonunu belirterek ismini verirken, polarize ışık düzlemini sağa mı yoksa sola mı döndürdüğü de (+) ve (-) ile belirlenir. Örneğin (S)-(+)- 2-bütanol veya (R)-(-)-2-bütanol gibi. Bu işaretle belirtilen optik çevirme yalnızca laboratuvarında ölçülmesi gereken fiziksel bir özellik olup bir molekülün mutlak konfigürasyonunun belirlenmesi ile hiçbir ilgisi yoktur (Atkins 1999).

2.4.2 Kiral kromatografi yöntemi

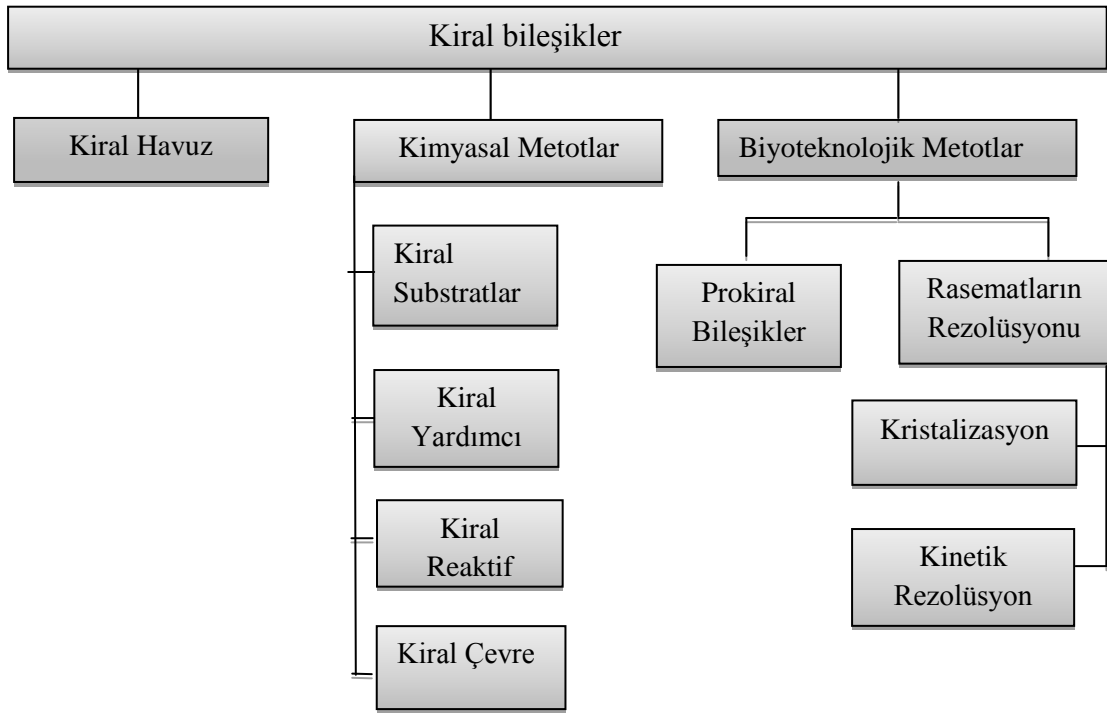
Bu yöntem, eser miktardaki safsızlıklardan etkilenmediği, hızlı ve kolay bir yöntem olduğu için enantiomerik karışımların ayrılmasında tercih edilmektedir. Başlıca; gaz kromatografisi (GC) ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır. Her iki yöntemde de enantiomerik saflığı yüksek kiral dolgu maddesi ile doldurulmuş kiral kolonlar kullanılır. Enantiomerler, kiral sabit faz ile etkileşime girerek farklı oranlarda ayrılırlar (Aitken 1995). Kiral durgun faz ile enantiyomerlerin karışımının oluşturduğu diastereomerik kompleksler özdeş olmayan kararlılıklara sahip olacaklar ve farklı zamanda kolondan ayrılacaklardır (Yüksekdanacı 2010).

2.4.3 NMR spektroskopisi

Enantiyomerler NMR spektrumlarıyla kiral olmayan bir ortamda ayrılamaz. Çünkü rezonansları eşit miktarda kimyasal kaymadadır (izokronlar). Aksine diastereomerler ayrılabilir. Çünkü belli (kesin) rezonansları eşit olmayan kimyasal kaymadır (anizokronlar). Bu nedenle NMR kullanılarak enantiyomerik saflığın belirlenmesi ancak diastereomerler karışımına çevrilerek yapılabilir. Bunun için de kiral bir yardımcı gereklidir. Üç tip kiral yardımcı kullanılır. Bunlar; diastereomerlerden kiral türevlendirme reaktifi (CDAs), kiral çözme reaktifi (CSAS) ve kiral lantanit kaydırma reaktifi (CLSRs) ki bu substrat enantiyomerleriyle diastereomerik komplekslerden oluşur. Kiral türevlendirme maddeleri güvenilir ve etkilidir. Ama deneysel olarak zahmetlidir. Kiral lantanit kaydırma reaktifleri de eşdeğer olarak etkilidir. Ancak uygulamaları deneme-yanılma yöntemine ihtiyaç duyar. Kiral çözme maddeleri verimli ve basittir. Ancak yeterince gelişmemiştir ve şimdiye kadar uygulama oranları sınırlıdır.

2.5 Kiral Maddelerin Üretimi

Enantiyomerik olarak saf bileşikler, genel olarak doğal kaynaktan izole edilebildikleri gibi, prokiral substratlardan veya rasemik karışımlardan da elde edilmektedirler.

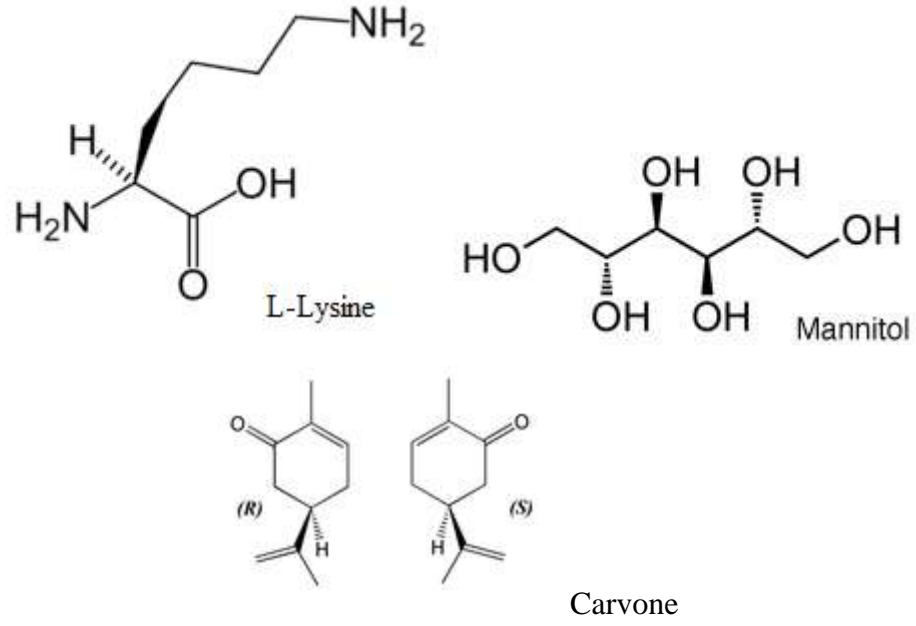


Şekil 2.5 Enantiyomerikçe saf bileşikleri sentezleme yöntemleri

2.5.1 Kiral havuz

Kiral havuz yöntemi, hedef ürünü sentezlemek için, kiral başlangıç malzemesi olarak enantiyomerik olarak saf doğal bileşiklerin kullanılmasına dayanır (Clayden 2000). Günümüzde organik kimyacılar tarafından bilinen çok sayıda kiral yapı taşı bulunmaktadır. Endüstride yaygın olarak kullanılan yapı taşlarının çoğu doğaldır. Dolayısıyla “kiral havuz” tabiri, ucuz ve kolaylıkla bulunabilen doğal ürünleri ifade etmede kullanılır. Bu doğal kiral yapı taşları amino asitler, sekerler, terpenler ve bunların türevleridir (Demirtaş 2009).

Kiral havuzu yöntemi ekonomik bir tekniktir, ancak doğal kaynaklar ve onların saflaştırma maliyeti bakımından bazı sınırlamalara sahiptir. Arzu edilen kiral özelliklere ulaşmak için bir dizi modifikasyon ile yapı değiştirilebilmektedir (Collins 1992). Kiral havuz maddelerine, aminoasitler ve karbonhidratlar örnek verilebilir.



Şekil 2.6 Kiral havuz bileşiklerine örnekler

2.5.2 Kimyasal yöntemler

2.5.2.1 Kiral substratlar

Bu yöntemde, stereoseçimli bir reaksiyonu kontrol edebilen, kiral bir başlangıç maddesi seçilir. Kiral havuz maddeleri, bu tip kiral başlangıç maddelerinden meydana gelmiştir. Bu yaklaşım doğal kaynakların bulunabilirliği ve onların saflaştırma maliyeti bakımından bazı sınırlamalara sahiptir (Ager 1995).

2.5.2.2 Kiral destek

Doğal kaynakları kullanışlı ara ürünlere dönüştürmek birçok adım gerektirebilir. Bazen bu adımları gerçekleştirmek için pahalı reaktifler kullanılır. Bu nedenle akiral bileşiklere bağlı olarak kiral gruplar geliştirilmiştir. Bu kiral gruplar, diastereoseçicilik elde etmek üzere bir dizi reaksiyon sayesinde seçiciliğe neden olurlar. Kiral yardımcı maddenin uzaklaştırılmasından sonra, ürünün içinde tek bir enantiyomer kalır. Kiral destek yaklaşımı, desteğin yerleştirilmesi ve uzaklaştırılması olmak üzere iki ek adımı da içerir ve proses sonunda geri kazanılabilirse yeniden kullanılabilir (Ager 1995).

2.5.2.3 Kiral ayırıcı

Bu yöntemde, enantiyomerik olarak saf bileşikler elde etmek için prokiral bir substrat ile kiral bir ayırıcı reaksiyona girer. Kiral ayırıcı, maliyetinden dolayı, stokiometrik miktarlarda reaksiyon ortamında olmalıdır. Bu ayırıcılar, spesifik fonksiyonel grup ilavesi ile seçimli yapılabilir (Noyori 1990).

2.5.2.4 Kiral çevre

Bir reaksiyon ortamına kiral çözücüler ya da katkıları eklenerek kiral çevre oluşturulabilir (Ager 1995).

Kiral çevre tepkimenin diastereomerik geçiş halinin serbest enerjisini değiştirerek iki diastereomerik yol izinin bir tanesinin gerçekleşmesini sağlar ve yüksek optik saflıkta ürün elde edilebilir. Çoğu durumda çok verimli bir yöntem değildir (Faber 2000).

2.5.3 Biyoteknolojik yöntemler

Kimyasal yöntemlere alternatif olarak, hücre kültürleri ve enzimler kullanılarak, prokiral maddelerden optik saflıkta kiral bileşikler oluşturmak, daha pratik ve etkili bir yoldur (Wong 1995).

2.5.3.1 Pro-Kiral bileşiklerden kiral maddeler

Stereokimyada, akiral formdan, kiral forma dönüşebilen bir bileşiğe prokiral denir. İki özdeş grubu olan tetrahedral karbon bir prokiraldir ve bu gruplardan birinin yer değiştirmesi ile kiral forma dönüşür. Bu işlem asimetric sentez olarak bilinir (Atkinson 1995). Asimetric sentezde kiral grup, kiral çevre ve kiral başlangıç maddesinin seçimi oldukça önemlidir. Bu gruplar seçilirken aşağıda belirtilen faktörler göz önünde tutulmalıdır:

- Yüksek enantiyoseçimlilik,
- Kullanılan grup reaksiyon sırasında yeni bir kiral merkez oluşturmali,

- Reaksiyon bittikten sonra hiçbir rasemizasyona neden olmamalı ve ortamdan basit bir şekilde uzaklaştırılabilmesi,
- Kullanılan kiral grubun enantiyomerik saflığında hiçbir değişiklik olmadan yüksek verimle geri kazanılabilmeli,
- Kiral grubun elde edilmesi ucuz ve hızlı olmalıdır.

Kiral substratlar, kiral reaktifler, kiral çevre ya da kiral katalizörler kullanılarak optikçe aktif maddeler elde edilebilmektedir. Kiral katalizör yönteminde, organik katalizörler ve geçiş metallerinin oluşturduğu katalizörler tercih edilmektedir. Son yıllarda gelişen biyoteknoloji yöntemleriyle birlikte biyokatalizörler olan enzimlerle de bu işlemler gerçekleştirilmektedir. Kimyasal yöntemlere göre enzimler; spesifitesi, kolaylığı ve ucuzluğu gibi birçok sebep dolayısıyla daha çok tercih edilmektedir (Anderson ve Allenmark 2002).

2.5.3.2 Rasematların rezolüsyonu

Rezolüsyon, rasemik bir bileşiğin enantiyomerlerine ayrılma işlemidir (Porter 1991). Bu yöntemde, prokiral bileşiklerden rasemik olarak elde edilen kiral bileşikler, genellikle, diastereoizomere dönüşürme ve kinetik rezolüsyon gibi yöntemler kullanılarak ayrıştırılmaktadır.

2.5.3.2.1 Kristalizasyon

Rasemik bileşik, optikçe aktif bir madde ile reaksiyona sokularak diastereomerlerine dönüştürülür. Elde edilen diastereomerler fiziksel özelliklerinin farkından dolayı birbirinden ayrıştırılabilirler. Bu farklılıklara kaynama noktası, bir kristal türevinde çözünürlük ve kromatografik adsorpsiyon gibi örnekler verilebilir. En iyi bilinen şekliyle, saf bir enantiyomer ile reaksiyona giren rasemik bir karışım çözeltisi (metanol veya su), diastereomerlerine dönüşür ve daha sonra kristallendirilerek diastereomerler uzaklaştırılır (Ghanem 2004).

2.5.3.2.2 Kinetik rezolüsyon

Bu yöntemde iki enantiyomerin kiral madde ile verdikleri reaksiyonların hızları farklılık gösterir. Bu durum, oluşan diastereomerlerden birinin diğer izomere göre daha hızlı olduğu anlamına gelir.

Kinetik rezolüsyon;

- Kimyasal kinetik rezolüsyon,
- Enzimatik kinetik rezolüsyon olmak üzere iki şekilde yapılır.

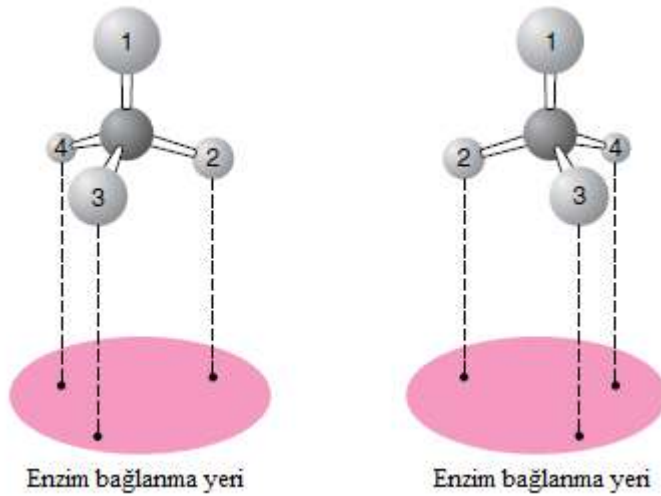
Kiral girdi, biyokatalizör olarak enzim veya mikroorganizma, kimyasal katalizör olarak kiral metal kompleksi, kiral asit ya da baz olabilir ve ortamda katalitik miktarda bulunmalıdır. Kinetik rezolüsyon, pratik uygulamalarda, özellikle de endüstriyel boyutta teorik verimin % 50'yi geçmemesi, kalan substratın, üründen ayrılması güç olabilmesi ve dönüşümün % 50 olduğu durumlarda tepkimenin sonlandırılması gerekliliği gibi birçok dezavantaja sahiptir (Faber vd. 1999).

2.6 Kiral İlaçlar

Son yıllarda yapılan bir tespite göre dünyada pazarlanan reçeteli ve kayıtlı ilaçların sayısı 2.000 civarındadır. Bunların yaklaşık üçte biri ya doğal üründür ya da doğal ürünlerin kimyasal modifikasyonu şeklinde elde edilmişlerdir. Doğal ürünlerden elde edilen ilaçların çoğu kiral olup çoğu zaman rasem karışım şeklinde değil de bir tek enantiyomer olarak elde edilirler. 1300'den fazla ilaçta bulunan 500'ün üzerindeki kiral madde sentetik organik kimya ürünleridir. Son zamanlara kadar böyle maddeler, birkaç istisna dışında, uygun terapi aktivitesinin enantiyomerlerin yalnız birinde mevcut olmasına rağmen rasem karışımlar halinde elde edilir, satılır ve uygulanırdı. Bu yöntem güvenlik ve yararlılıktan tutun, sentetik metodoloji ve ekonomiye kadar bir takım faktörlerin etkisi ile kiral sentetik ilaçların enantiyomerik olarak saf halde daha fazla elde edilmesi şeklinde hızlı bir değişikliğe uğradı. Çoğu biyolojik işlemlerin doğasında yüksek derecede kiral tanıma (seçicilik) olduğundan bir kiral ilacın her iki enantiyomerinin de aynı düzeyde ve hatta aynı türden etkiyi sergilemeleri olanaksızdır.

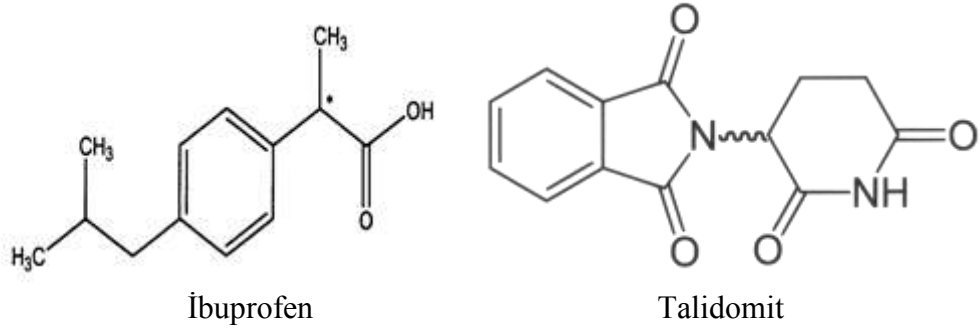
Böyle bir durumda bir eantiyomer uygun etkiye sahipken, diğeri biyolojik bir aktivite bile sergilemez.

Günümüzde var olduğu tahmin edilen 25000 enzimden yaklaşık 4000 tanesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından kabul edilmiş ve sınıflandırılmıştır (Krishna 2000). Çoğunluğu oksidoredüktazlar, hidrolazlar ve transferazlar olmak üzere 400 tanesi araştırmalar için ticari olarak elde edilebilmektedir.



Şekil 2.7 Enzim substrat kompleks oluşumu

Bu durumda rasem karışım %50 saf bir ilaçtır ve %50 gereksiz madde içermektedir. Yalnız gerçekte bu durum daha karmaşıktır. Örneğin ibuprofenin ağrı kesici özelliğinden sorumlu olanı *S* enantiyomeridir. Fakat *R* enantiyomerinin de bulunduğu rasemik ibuprofenin %50'lik kısmı ise vücutta (*S*)-ibuprofene dönüşür. Rasemik karışımlar halinde kullanılan kiral ilaçlar için bir örnek de 1959-1962 yıllarında Avrupa'da yatıştırıcı ve mide bulantısını önleyici bir ilaç olarak kullanılan talidomidtir. (*R*)-talidomid yararlı özellikler gösterirken (*S*)-talidomid biyolojik aktivite açısından çok farklı özellikler göstermiştir. Şöyleki, bunu hamilelik sırasında alan 2000'den fazla kadın tarafından doğurulan çocuklarda ciddi boyutlarda doğum kusurlarından (*S*)-talidomidin sorumlu olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2.8 Kiral ilaçlardan ibuprofen vetalidomit

Kimyasal reaksiyonların stereokimyasını kontrol eden faktörleri anlamaya yönelik temel araştırmalar, kirale moleküllerin enantiyomerlerinin saf olarak elde edilmesini sağlayan yeni sentetik metodların gelişmesine yol açmıştır. Bugün çoğu büyük eczacılık şirketleri mevcut ilaçlarından hangilerinin tek bir enantiyomer halinde sentezlendiğinde yararlı aktivite göstereceğini inceleyerek ve ayrıca yeni bir ilaç elde ederken hangi enantiyomerin aktivite gösterdiğini tespit edip onu elde edecek şekilde yöntemler geliştirmişlerdir. Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Teşkilatı (FDA) böyle bir yaklaşımı destekleyici tüzükler yayınladı, ancak özel durumlar garanti edildiğinde yeni ilaçların rasem karışımlar halinde onaylanmasına açık kapı bıraktı. Mevcut ilaçların, saf olarak bir enantiyomerinin hizmete sunulması genellikle üstün etkinlik ve yeni yöntemlerinin geliştirilmesi ile kolay üretimden kaynaklanmaktadır ve bu tip ilaçlar genellikle orijinal ilaçlarınkinden ayrı olarak patent korumasına tabidirler (Atkins 1999).

2.7 Enantiyomerik Safılıktaki Kiral Alkoller

Enantiyomerik safılıktaki kirale alkoller, pek çok farmakolojik ürünün çıkış maddesidir. Sekonder alkol olan 1-fenil 1-propanol ilaç etken maddesi olarak farmasotik sanayide geniş kullanım alanlarına sahiptir. Son zamanlarda (R)-1-feniletanol ve (S)-1-feniletanol parfüm üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. (S)-Efedrin HCl ticari adıyla bilinen bir türevi (1-(R), 2-(S)-2-metilamino-1-fenil-1-propanol hidroklorür) bronş açıcı ilaçlar grubuna girmektedir (www.pharma-solutions.basf.com). Bu ilaçlar astım, bronşit ve akciğer ile ilgili hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. (R)-Pseudoefedrin HCl (1-(S), 2-(S)-2 metilamino-1-fenil-1-propanol hidroklorür) ise Efedrin'in diastereomeridir. Genellikle antihistamin, parasetamol ve ibuprofen içeren karışımlarda bulunur ve

“Sudafed” adıyla tanınmaktadır (<http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudoephedrine>). 1-fenil 1-propanolün diğere bir türevi olan PDMP (D-threo 1-fenil-2-dekanoyilamino-3-morfolino 1-propanol) kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Rasemik 1-fenilpropanol ise koleretik (karaciğere safra üretimini arttıran ajan) bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu kimyasalın (R)-izomeri ise optikçe aktif 1-kloro-1-fenilpropan sentezinde ve terpenlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Uzura 2001).

2.8 Biyotransformasyon ve Kısa Tarihçesi

Biyotransformasyon, enzimler veya enzim yapıları içeren biyolojik sistemler tarafından bölgesel ve stereo seçimli olarak katalizlenen kimyasal dönüşümler olarak tanımlanabilir (Ji-Hua vd. 2010). Biyotransformasyon ile kimyasal dönüşümler, canlı organizma veya enzimlerin katalizör olarak kullanılması ile bir substrattan istenen ürünün bir veya birkaç basamakta oluşumu ile gerçekleşir (Kieslich 1984).

Klasik yöntemlerle sentezlenmesi zor ya da imkansız olan bir çok ilaç, koku ve tat hammaddesi biyotransformasyonla ucuz, çabuk ve verimli bir şekilde elde edilebilmektedir. Ürünlerin stereokimyasal özelliklerinin de korunabilmesi, genellikle rasemik ürünler veren kimyasal sentezlere karşı üstünlüklerinden biridir (Kırimer 2004).

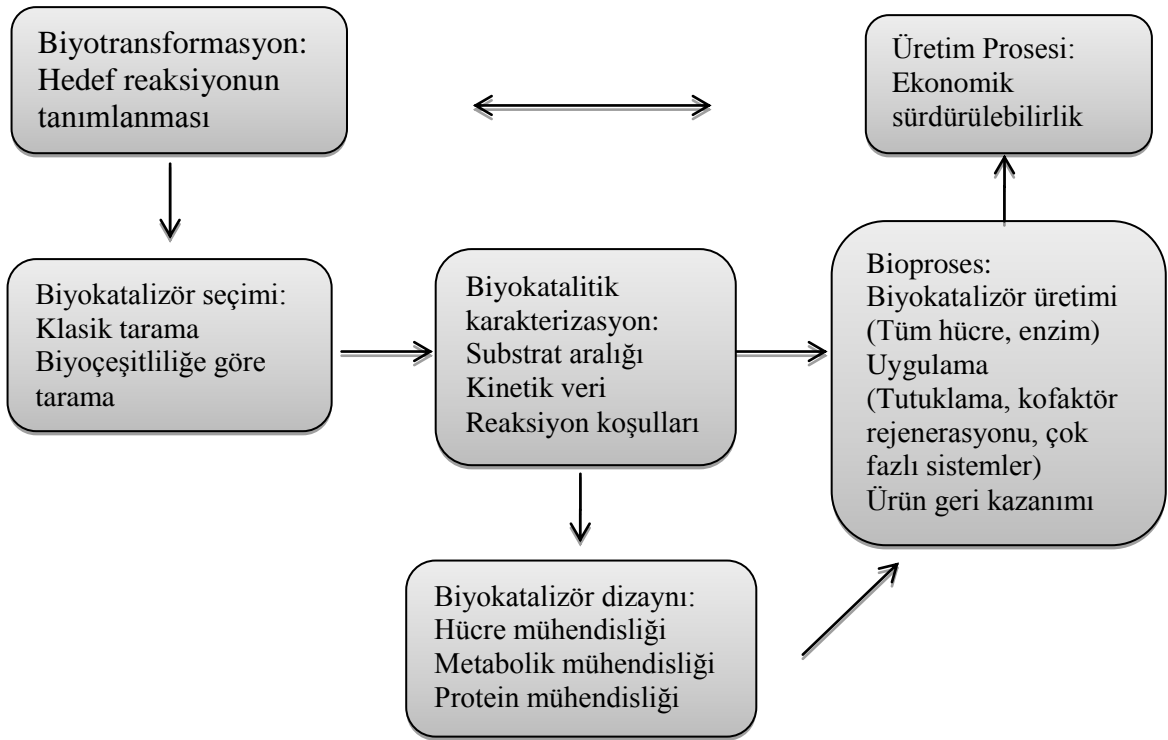
Biyotransformasyon alanındaki ilk çalışma, Pasteur tarafından 1858 yılında yapılmış olan bir kinetik rezolüsyon çalışmasıdır. Çalışmada, penicillium glaucum küfö ile DL-amonyum tartarattan, L-amonyum elde edilmiştir. Pasteur’un 1864 yılında yayınlamış olduğu başka bir çalışmada, etanolün önce Acetobacter aceti olarak tanımladığı sonra Mycoderma aceti veya Bacterium xylinum olarak tanımladığı organizmalar ile asetik aside dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar Brown tarafından 1886 yılında geliştirilerek, Bacterium aceti olarak tanımlanan mikroorganizmalar ile propanol propiyonik aside yükseltgenmiş böylece etanolün oksidasyonunu gerçekleştirilmiştir.

Günümüzde hala kullanılan biyotransformasyon çalışmalarının temeli, 1920 ve 1940’lı yıllar arasında atılmıştır. Bu dönem boyunca çok sayıda biyosentetik ve genel metabolik yollar, bu yollardaki muhtemel ara ürünler ve onlarla ilgili bileşikler, biyotransformasyon çalışmaları ile belirlenmiştir. Ayrıca, yine bu dönemde, aromatik

bileşiklerin parçalanması aydınlatılmış ve bazı enzim sistemleri ayrılmıştır (Faber 2003).

2.9 Biyotransformasyon Proseslerinde Kilit Adımlar

Biyotransformasyon prosesleri geliştirilirken, izlenen adımlar şematik olarak gösterilmiştir;



Sekil 2.9 Biyotransformasyon prosesi geliştirme adımları

Biyotransformasyon proseslerinde ilk tasarım parametresi biyokatalizör seçimidir. Seçilen biyokatalizör ile biyotransformasyon prosesinin etkinliği, optimum çevresel koşullar sağlanıyorsa maksimumdur. Kullanılan biyokatalizörün ilgili reaksiyonu yüksek verimle katalizlemesi gerekmektedir (Leuenberger 1984).

Biyotransformasyonlar, kimyasal reaksiyonlara göre daha kolay gerçekleşen reaksiyon adımlarına sahiptirler. Bu durumda substrat, istenen ürüne kolayca dönüşebilir.

Biyotransformasyonun gerçekleşmesi için substrat molekülü ile enzim molekülünün teması sağlanmalıdır. Substrat biyoteknoljide ortamında çözülebilmelidir.

Substrat çözünmüyor ise, ortama suyla karışan fakat toksik etkisi olmayan çözücüler (etanol, aseton, dimetil sülfoksit) eklenebilir (Leuenberger 1984) veya emülsiyon yapıcı bir bileşen kullanılabilir.

Suda çözünmeyen birçok organik maddenin biyotransformasyonu tek fazda gerçekleşmediği durumlarda çok fazlı sistemler kullanılabilir. Bu sistemler aynı zamanda inhibisyona neden olan ürünleri eş anlı olarak uzaklaştırarak önleyebilir. Genel olarak çok fazlı biyotransformasyon sistemlerinin kullanılmasının amacı, biyoteknolojide suda çözünmeyen substrat veya ürünlerin bulunduğu proseslerde verimliliği arttırmaktır (Lilly 1982).

Biyotransformasyonlar temelde izole enzimler veya bütün hücre sistemleri ile olmak üzere iki ayrı şekilde gerçekleştirilir. Bütün hücre sistemleri tabiri genel olarak mikroorganizmalar ile bitki ve hayvanlara ait hücre, doku ve organ kültürlerini içerir (Lilly 1993).

Bazı durumlarda hücre içindeki enzimler yan reaksiyonları da katalizleyebilir veya substrat hücre membranından geçemeyebilir. Bu durumda tutuklanmış enzim veya saf enzim kullanmak daha avantajlıdır. Tutuklanmış enzimlerin reaktörde tutulması ve uzaklaştırılması kolay olmakla beraber kararlı işletim koşullarında çalışarak ürünün uzaklaştırılması ve saflaştırılması kolaylıkla gerçekleştirilebilir fakat difüzyon kısıtlamaları ve ek maliyet getirmesi gibi dezavantajlara sahiptir.

Enzim saflaştırma işlemi ise uzun zaman alan, yorucu ve pahalı bir yöntemdir ve hücrenin parçalanması, ekstraksiyon, deriştirme, fraksiyonlama, çöktürme ve kurutma gibi basamakları gerektirir.

Biyotransformasyon proseslerinde reaktör seçimi yapılırken, gerekli karıştırma, biyokatalizörün kullanılabilirliği, kütle aktarım özellikleri gibi bazı kriterler vardır. Çok

fazlı sistemlerde bunlara ek olarak düşünülmesi gereken nokta, reaksiyonun hangi bölgede gerçekleşeceği. Özellikle serbest hücreler ile çalışıldığında, iki faz arasında yüksek kütle aktarım hızı için yeterli ara yüzeyin sağlanması gerekir. Bu amaçla karıştırmalı tank kullanmak uygundur. Ayrıca havadan oksijen aktarımı gereken sistemlerde karıştırmalı tank reaktörler tercih edilir. Karıştırmalı tank reaktörlerde reaksiyon hızları, karıştırma hızına ve organik ve sulu fazların oranına bağlıdır. Tutuklanmış biyokatalizörler için ise dolgu kolon reaktörler kullanılabilir (Brink 1988).

Dolgu kolon biyoreaktörler, içi biyokatalizör tanecikleri ile dolu olan borsal reaktörlerdir. Bu tür bioreaktörler, basit işletim koşulları ve yüksek reaksiyon hızı avantajına sahiptir. Yüksek katı sıvı temas alanı ve akış hızı, durgun katı partiküller üzerinden akan sıvının, kütle aktarımı kısıtlamasına neden olan film direncini önemli ölçüde azaltırlar (Wanga 2007).

Biyotransformasyon prosesinin endüstriyel ölçekte uygulanabilmesi için, biyotransformasyon hızının ve veriminin artırılması gerekir. Yüksek verim için optimum ortam tasarımı yapılmalıdır. Biyotepkime sıcaklığı seçiminde, biyokatalizörün kararlılığı ve biyotepkime hızı etkili olmaktadır. Maksimum sıcaklık, biyokatalizör, ürün ve substratların kararlılığı ile sınırlıdır. Benzer şekilde ürün, substrat ve biyokatalizör kararlılığı ve aktivitesi için optimum pH değerleri de farklı olabilir (Lilly 1992).

Yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerinde, NAD (Nikotinamid Adenin Dinükleotid) ve NADP (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat) gibi kofaktörlere ihtiyaç duyulur. Bu kofaktörler, reaktörlere serbest yada tutuklanmış şekilde eklenebilirler (Kloosterman ve Lilly 1985).

2.10 Biyotransformasyon ve Enzimler

Enzimler, canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için gerekli olan biyolojik katalizörlerdir (Yıldız 2000). Enzimler, oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar,

liyazlar, izomerazlar ve ligazlar, olmak üzere altı ana sınıf altında toplanmıştır (Whitford 2005).

Günümüzde var olduğu tahmin edilen 25000 enzimden yaklaşık 4000 tanesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından kabul edilmiş ve sınıflandırılmıştır. Çoğunluğu oksidoredüktazlar, hidrolazlar ve transferazlar olmak üzere 400 tanesi araştırmalar için, ticari olarak elde edilebilmektedir (Krishna 2000).

Çizelge 2.1 Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması

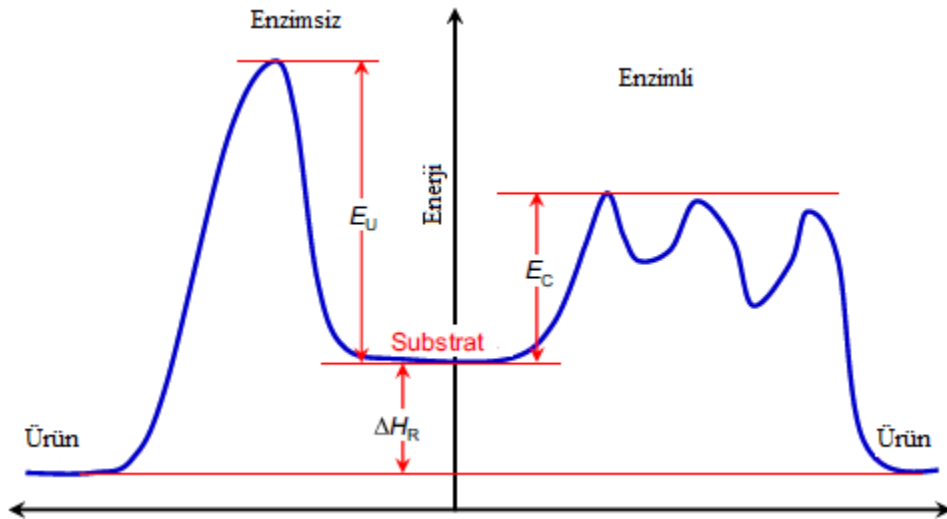
No	Sınıf	Tepkime tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi (hidrit iyonları ve H atomları ile)
2	Transferazlar	Grup-transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri (işlevsel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Grupların ilavesi ve yer değiştirmesiyle çift bağların oluşması
5	İzomerazlar	İzomerik formlar için moleküller içinde grupların transferi
6	Ligazlar	ATP'nin harcanmasıyla C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

Enzimatik reaksiyonların avantajları;

- Enzimatik bir reaksiyon, enzimsiz gerçekleşen aynı reaksiyona göre 10⁸-10¹⁰ kez daha hızlıdır,
- Enzimlerin çalışma koşulları benzer ya da aynı olduğundan tek bir ortamda çeşitli biyokatalitik reaksiyonlar gerçekleştirilebilir. Multienzim sistemleriyle ardışık reaksiyonlar gerçekleştirilebilmesi reaksiyon prosesini kolaylaştırır,
- Enzimler geniş substrat aralığına sahip olduklarından dolayı, doğal substratları olmayan sentetik substratlar üzerinde de etkili olabilirler. Ayrıca sıklıkla sulu ortamda çalışmayı gerektirmezler. Bu da organik çözücülerin kullanılmasını gerektiren durumlar için bir avantajdır (Faber 2004).

Kimyasal katalizörlere benzer şekilde enzim biyokatalizörleri de reaksiyon hızını arttırmalar. Biyokatalizörlerin katalizlediği reaksiyonlar, düşük aktivasyon enerjisinden dolayı, ılımlı koşullarda ve yüksek reaksiyon verimi ile gerçekleşirken, kimyasal katalizörlerin aksine biyokatalizörlerde dikkat çeken en önemli özellik yüksek spesifiktir.

- Reaksiyon spesifikliği; Enzim tek bir biyotransformasyon reaksiyonunu gerçekleştirir. Fonksiyonel grubun bir tek tipi üzerine seçicilik gösteren enzimlerin bu özelliği sayesinde reaksiyon verimli ve yan ürün olasılığı düşük olarak gerçekleşir.
- Bölgesel spesifiktik; Kompleks üç boyutlu yapıları sayesinde enzimler aynı substrat molekülün farklı bölgelerindeki fonksiyonel gruplara seçicilik gösterirler
- Sterospesifiktik; Enzimin aktif merkezi asimetrik çevre sağlar. Bu da rasemik substratların enantiyomerleri arasında ayırım yapmaya izin verir. Böylece bir ya da tercih edilen enantiyomerlerden en az olanı katalizlenir. Ayrıca, eğer enzim reaksiyonu yeni asimetrik merkezleri üretiyor ise bu genel olarak bir enantiyomer formundadır ve ürünler optikçe aktiftir (Kapucu 2000).



Şekil 2.10 Enzimatik olarak katalize edilmiş ve katalize edilmemiş reaksiyonların aktivasyon enerjileri $E_U < E_C$

Biyotransformasyon reaksiyonlarında, mikroorganizmalar, canlı bitkiler, bitki doku ve kültürleri, canlı hayvanlar, hayvan doku ve kültürleri, insan metabolizması gibi tüm hücre sistemleri ve enzimler biyokatalizör olarak rol almaktadırlar. Biyotransformasyon reaksiyonlarında genellikle bütün hücre sistemlerinin tercih edilmesinin nedenleri ise şöyle sıralanabilir (Rajaguru 2001);

- Potansiyel olarak yararlı pek çok enzim doğal ortamı olan hücre dışında kararsız olabilir.
- İntrasellüler enzimler hücre dışında özellikle hücre gelişmesi sırasında salınan proteazlar gibi enzimlerin hidrolitik saldırısına maruz kalabilirler.
- İntrasellüler enzimler aktivite gösterebilmeleri için bir ya da daha çok kofaktöre ihtiyaç duyarlar. Bu kofaktörler canlı hücre içerisinde hazır iken hücre dışında bunların sağlanması ekonomik bir güçlüktür.
- İntrasellüler enzimlerin izole edilmesi zaman ve kaynak yönünden pahalı olabilir.

Organik sentezdeki en önemli amaçlardan birisi spesifik stereoizomerleri saf halde elde edebilmektir. Bu, özellikle sadece bir izomerin biyolojik aktiviteye sahip olduğu ilaçların üretiminde oldukça önemlidir. Bu amaçla, ilaç üreticileri hem toplam verimi düşüren hem de maliyeti artıran uzun ayırma işlemlerini gerçekleştirmek durumunda kalabilirler. Bu bakımdan enzimlerin ve mikroorganizmaların kullanılması paha biçilmezdir; çünkü bunlar genellikle sadece saf stereoizomerleri verirler (Karaküçük 2006).

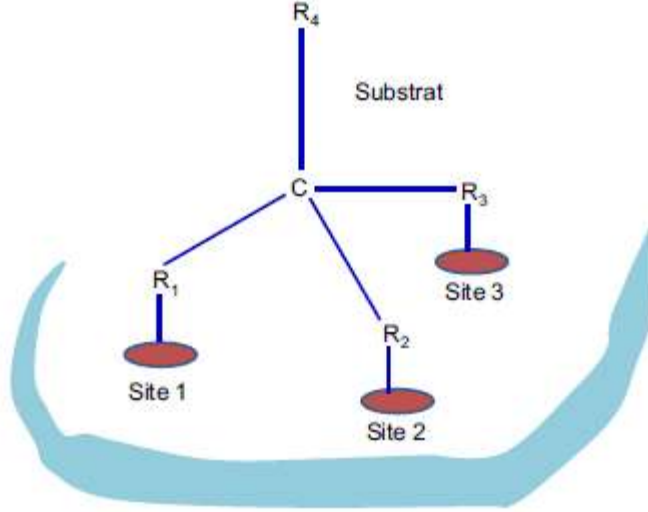
2.11 Enzimin Substratla İlişkisi

Enzimin substratla birleştiği ve katalitik reaksiyonun meydana geldiği kısma aktif bölge denir. Aktif bölge ikiye ayrılır:

a. Substrat bağlayan kısım: Substratla bağlanmayı yapan bölge.

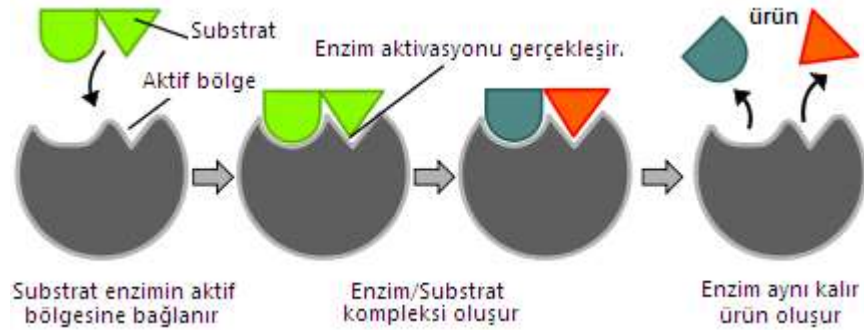
b. Katalizleyici kısım: Substratın ürün veya ürünlere dönüşmesini sağlayan kimyasal reaksiyonu kataliz eder (kofaktör veya kofaktör içermeyen enzimlerde polipeptid

zincirlerindeki bazı amino asitlerin özel bir şekilde gruplanmasıyla meydana gelen bölge).



Şekil 2.11 Enzim ve substratın üç nokta etkileşimi (Liu 2013)

Bazı enzimlerin katalitik aktivite göstermeleri için kofaktöre gereksinimleri vardır. Enzimlerin aktif bölgelerinin substratla birleşmesine uygun konformasyonları vardır. Enzim-substrat birleşmesi için kilit-anahtar modelinin var olduğu Fischer tarafından ileri sürülmüştür. Diğer bir deyişle, kilit ve anahtar uyumu enzimle substrat arasında da bulunmaktadır. Enzimlerin substratla birleşmesini açıklamada, Koshland tarafından ileri sürülen uyum oluşturma modeli de vardır. Bu modelde enzim, konformasyon değişikliğine uğrayarak, enzimdeki belirli fonksiyonel grupların kataliz için en uygun konuma gelmesi sağlanır. Şekil 4.12’de enzim substrat ilişkisi verilmiştir.



Şekil 2.12 Enzim substrat ilişkisi

Enzim-substrat birleşmesinde çeşitli bağların rolü vardır. Enzimle substrat arasında çok defa kovalent bağlar meydana gelir. Bu bağlar enzimin apo enzim kısmı ile substrat arasında olur. Enzimin apoenzim kısmı yani protein kısmında substrat ile bağ meydana getiren gruplar, amino asit zincirinde bulunan serbest –SH, -OH, -NH₂ gibi gruplardır. Kofaktör içermeyen enzimlerde, bu gruplar substratı bağlarlar, başka gruplar ise substratı parçalarlar (Can 2008).

2.12 Biyotransformasyonda Reaksiyon Tipleri

Aşağıda sıralanan reaksiyon tipleri, biyotransformasyonların neredeyse tüm sentetik reaksiyonlara eşdeğer reaksiyonları yapabileceğini göstermektedir (Akar 2006).

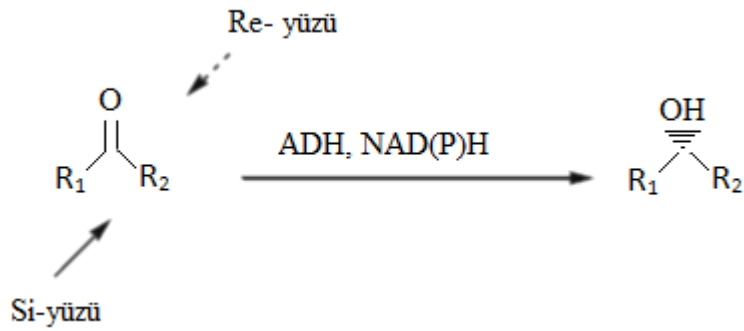
- Oksidasyon (hidroksilasyon, epoksidasyon, dehidrojenasyon, Baeyer Villiger oksidasyonu, kısmi oksidatif degradasyon),
- Redüksiyon (aldehitlerin, ketonların, karboksilik asitlerin, heteroatomların indirgenmesi, çifte bağların halojenasyonu),
- Hidrolitik reaksiyonlar (esterlerin, C-N ve epoksitlerin hidrolizi, C=C bağlarına su girişi, N-demetilasyon),
- Katılım ve kondenzasyon, (ester ve amit bağlarının oluşumu, asikloin kondenzasyonu, C=C bağlarına amonyak ilavesi, birleşme reaksiyonları),
- İzomerizasyon

2.13 Biyotransformasyon Çalışmalarında Oksidoredüktazlar

Tüm hücre sistemlerinde kullanılan birçok yükseltgenme ve indirgenme tepkimelerinin asıl katalizörleridir. Asetaldehitten bisiklik ketonlara kadar geniş bir substrat aralığına sahiptir. Yükseltgenme tepkimeleri dehidrogeazların indirgeme tepkimelerine göre daha dar bir kullanım alanına sahiptir. Çoğunlukla kiral alkolle kinetik ayrışma enantiyomerlerden birinin seçimli olarak oksitlenmesi ve ortamın diğer enantiyomer bakımından zengin hale gelmesi ve dinamik kinetik ayrışma tepkimelerinde kullanılır (Gruber 2006). Dehidrojenaz enzimlerinin biyotransformasyon çalışmalarında en geniş kullanım alanı indirgeme tepkimeleridir. Bu enzimler EC.1.1.1 grubu altında toplanan

dehidrogenazlar ve redüktazlardır. Bu tepkimeler ile kiral alkollerin, hidroksi asitlerin ve aminoasitlerin üretilmesi mümkündür (Namakura 2003).

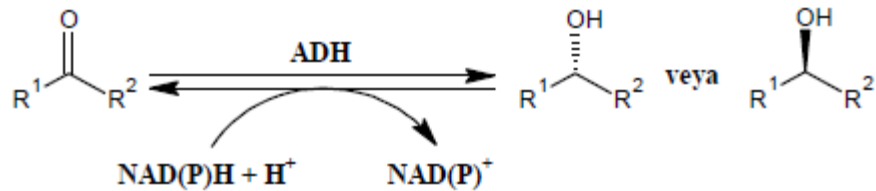
Alkol dehidrojenaz (ADH) enzimini ve onun katalizlediği tepkimeleri örnek alırsak, 2 elektron indirgenen nikotinamid alıcı bir moleküle bir keton aktarılır. Bureaksiyon çoğunlukla oldukça seçici gerçekleşen bir reaksiyondur. Hidrat iyonu karbonil grubunun Re- ya da Si- yüzüne aktarılarak (R)- ya da (S)- alkol ürününü verir. (Şekil) Bu kurala uygunluk (Prelog kuralı) birçok ADH tepkimesi için geçerlidir (Buchholtz 2005).



Şekil 2.13 Prelog kuralına göre R₁ ve R₂ süstituentlerinin büyüklüklerine bağlı olarak (R₁ > R₂) gerçekleşen ADH katalizörlüğündeki indirgenme tepkimesi

2.14 Alkol Dehidrogenaz

ADH, NAD(P)H kofaktörü yardımıyla aldehit ve keton gibi karbonil grubu taşıyan bileşiklerin indirgenmesini ve alkollerin oksidasyonunu katalizleyen bir metalo enzimdir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 ADH katalizli asimetric indirgenme reaksiyonu

Saf alkol dehidrojenazlar kullanıldığında, tepkime ilerledikçe kofaktör tükeneceğinden, ortama kofaktör ilave etmek gereklidir. Ancak kofaktörler pahalı oldukları için bunların rejenerasyonu gerekmektedir. Saf enzimler yerine bitkileri, alkol dehidrojenaz kaynağı olarak kullanmak daha ekonomiktir. Bitki hücresinde bulunan GDH enzimi ve glikoz molekülü, kofaktör rejenerasyonunu sağlayabilir (Yang 2009).

ADH'lar özellikle kiral farmasötiklerin ve diğer biyolojik olarak aktif bileşiklerin üretimi için gerekli olan kiral alkollerin organik sentezinde önemli role sahiptirler (Tschaen 1995, Hussain 2008).

Enzimatik olarak sentezlenen bileşiklere örnek olarak alkil (R)-veya (S)-3-hidroksibütirat, (R)- veya (S)-1-asetoksi-2-propanol, (S)-2-bütanol (Pfaller 2007) veya (S)-2-pentanol (Peschko 2005) gibi alifatik (S)-alkoller verilebilir.



Şekil 2.15 Alkol dehidrojenaz (ADH) yapısı ve aktif merkezleri (Liu 2013)

ADH endüstriyel kullanımına örnek olarak, *Neurospora crassa* kaynaklı ADH ile glukom hastalığı için aktif olarak uygulanan karbonik anhidraz enzim inhibitörü Trusopt sentezindeki ara ürün eldesi verilebilir (Aleksy 1997).

2.15 Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Herhangi bir enzim için ideal bir aktivite belirleme yolu yoktur. Çünkü bir yöntemin uygunluğu belirli faktörlere bağlıdır. Bunların başında, enzimin saflığı, fizikokimyasal özellikleri, katalizlediği reaksiyonun tipi, lokalize olduğu yer, ölçüm yönteminin maliyeti, eldeki mevcut ölçüm cihazlarının niteliği ve ölçümün duyarlılığı ile ilgili zorunluluklar gelmektedir.

Enzimler, biyolojik ortamda çok az miktarda buldukları için miktarlarının ölçümü çok zordur, ancak aktiviteleri ölçülebilir. Bir enzimin aktivitesini çeşitli yollardan ifade etmek olasıdır. Örneğin, 1 mg enzim proteini tarafından birim zamanda meydana getirilen absorbans değişikliği bir birim olarak ifade edilebilir. Fakat dünya genelinde, elde edilen sonuçları karşılaştırabilmek için daha standart bir birim tanımlaması geliştirilmiştir. Bu standart birim Uluslararası ünite (International Unit; IU) veya enzim ünitesi olarak ifade edilmekte olup, 1 IU 1 mikromol substratı 1 dakika içinde katalizleyen enzim aktivitesi olarak tanımlanır (Özmen 2010).

2.16 Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Başlıca Yöntemler

2.16.1 Spektrofotometrik yöntem

Pek çok enzim substratı, ürünü veya koenzimi, görülen ışıkta veya ultraviyole ışıkta bir tepe değeri göstererek, absorbans vermektedir. Bu takdirde ya substratın kaybolması yada ürünün meydana gelişi gibi koenzimdeki değişiklik spektrofotometreden tayin edilir. Spektrofotometrik yöntem kolaylığı, basitliği ve hassas oluşu nedeniyle diğer yöntemlere göre daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntemde optik dansite değişimi, belirli miktardaki enzim ünitesini verir. Birçok enzimin aktivite tayini bu yöntem ile yapılmaktadır.

2.16.2 Kromatografik yöntem

Diğer yöntemlerle bir ölçme yapılamadığında bu yönteme başvurulur. Enzim substrat karışımlarından belli zaman aralıklarında örnekler alınır. Kromatografik yöntemde, substrat ve ürün kromatografi kağıdına veya ince tabaka kromatografisiyle birbirinden ayırt edilir. Bazı hallerde radyoaktif substrat kullanıldığı için ayırımdan sonra leke, ya ince tabaka kromatografisinde olduğu gibi kazınacak, yada kağıt kromatografisinde olduğu gibi kesilerek sayım şişelerine koyulacaktır. Radyoaktivite miktarı sayacıta sayılır ve tayini yapılır. Bazı enzim aktivitelerinde ürünün meydana getirdiği lekenin büyümesi ile enzim faaliyeti hakkında bilgi edinilir.

2.16.3 Kimyasal tayin yöntemi

Birçok enzim reaksiyon başladıktan sonra belirli zaman aralıklarında karışımdan örnek alıp, substrat ve ürünün kimyasal yöntem ile miktarı tayin edilir. Fiske ve Subbarow kalorimetrik yöntemi olarak inorganik fosfat tayinini gerçekleştirmiştir. Fosforilaz, fosfotaz, nükleotidaz enzimlerinin aktivite tayinleri aynı yolla yapılır. Pirofosfat (P_{pi}) bağı, bir normal HCl ve 100 °C'de 10 dakika kaynatılmakla kırılmakta ve inorganik fosfat meydana gelmektedir. İnorganik fosfatın miktarı ise, kalorimetrik yöntem ile tayin edilmektedir. ATP ve ADP'nin karıştığı bazı kinaz ve sentetaz reaksiyonlarında enzim aktivitesi bu yöntem ile tayin edilir.

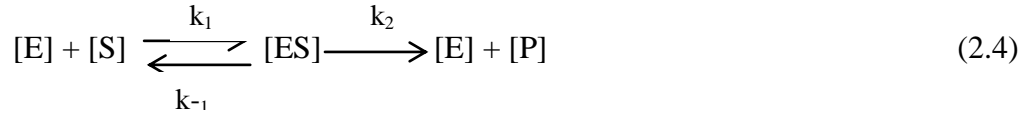
2.16.4 Thunberg yöntemi

Çok sayıda dehidrogenaz enziminin aktivitesi bu yöntem kullanılarak ölçülür. Metilen mavisi elektron akseptörüdür. Bu bileşiğin okside durumu renkli, redükte durumu ise renksizdir. Enzim aktivite tayin ortamına belirli miktarda metilen mavisi ilave edilir. Göz ile renk kaybolmasındaki geçen zaman saptanır. Deney havanın oksijeninden korunmak için özel bir tüpe yapılır. Bu özel tüpe "Thunberg tüpü" denir ve yöntemde adını bu tüpten almıştır (Özata 2014).

2.17 Basit Enzim Kinetiği için Mekanistik Modeller

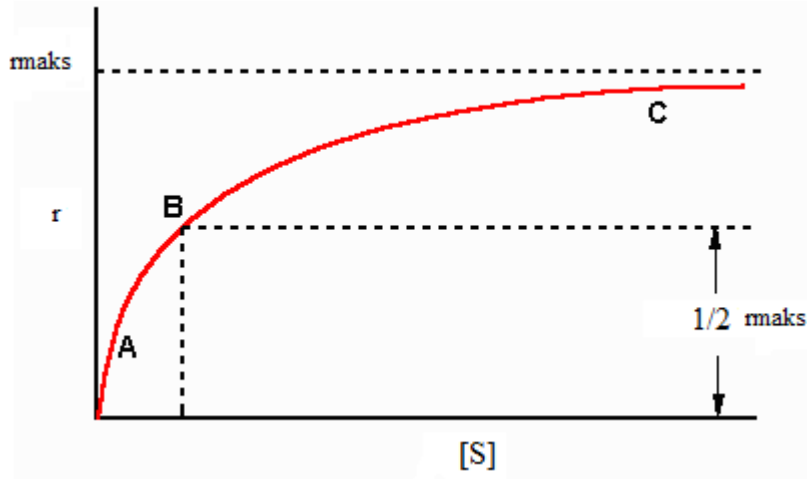
Tek substratlı enzim katalizli reaksiyonların matematiksel modeli ilk olarak V.C.R. Henri (1902) ve Michealis ve Menten (1913) tarafından geliştirilmiştir. Kompleks olmayan enzim katalizli reaksiyonların kinetiği genellikle Michealis-Menten kinetiği veya doygunluk kinetiği olarak adlandırılır.

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce “*Enzim-Substrat kompleksi*” oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve tekrar enzime dönüşür. Enzim kinetiği mekanizması aşağıdaki şekilde gösterilir:



Burada, enzim-substrat kompleksi [ES]; enzim [E] ve substrat [S]'den k_1 hız sabiti ile oluşur. Bu reaksiyonun hızlı ve tersinir olduğu, kimyasal bir değişim olmadan enzim ile substratın bir arada fiziksel kuvvetler yardımıyla buldukları kabul edilir. Daha sonra [ES] kompleksi, k_{-1} hız sabitli geri reaksiyonla ve k_2 hız sabiti ile ürün ve enzime ayrılır. Reaksiyon kararlı duruma ulaştınca “Kararlı Durum İlkesine” göre [ES]'nin oluşma hızı ayrışma hızına eşit olur, yani derişimi zamanla değişmez.

Burada r_{maks} ; hiperbol asimptotunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına ($r_{maks}/2$) karşılık gelen substrat derişimi K_M (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir. r_{maks} ve K_M , bir enzimin aktivitesini belirleyen özgün enzim sabitleridir. Enzimin substrata ilgisi ne kadar fazla ise K_M değeri o kadar küçüktür.



Şekil 2.16 Enzim katalizli bir reaksiyon için substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi

Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat derişimi düşük olacağından ($[S] \ll K_M$) grafik doğrusaldır. Burada reaksiyon hızı birinci derecedendir. İkinci bölgede substrat derişimi arttıkça reaksiyon derecesi birden sıfıra doğru azalır. Üçüncü bölgede $[S] \gg K_M$ 'dir. $r=r_{maks}$ olur ve reaksiyon değişmez bir hızla sıfıncı dereceden devam eder. Enzim katalizli reaksiyonlar için hız ifadesi oluşturulurken iki temel yaklaşım kullanılır;

- hızlı denge yaklaşımı
- yarı-yatışkın durum yaklaşımlarıdır.

Her iki yaklaşım da Eşitlik 2.4'de verilen mekanizmanın hız ifadesini oluşturmada aynı başlangıç aşamalarına sahiptir. Ürün oluşum hızı (r);

$$r = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \text{ ifadesi ile verilir.} \quad (2.5)$$

[ES] kompleksinin değişim hızı ise ;

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (2.6)$$

Enzim tüketilmediğinden, toplam enzim miktarı, ortamda serbest ve kompleks halinde bulunan enzimlerin toplamına eşittir;

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (2.7)$$

olarak yazılabilir. Bu noktada analitik çözüm için bir kabul yapmak gereklidir.

1. Hızlı denge kabulü: [ES] kompleksini oluşturmak için enzim ve substrat arasında hızlı denge kurulduğu kabul edilerek;

$$K_M' = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (2.8)$$

yazılabilir. Eşitlik 2.5 Eşitlik 2.6'da yerine koyulursa;

$$[ES] = \frac{[E_o][S]}{(k_{-1}/k_1) + [S]} = \frac{[E_o][S]}{K_M' + [S]} \text{ elde edilir.} \quad (2.9)$$

Burada K_M' , [ES] kompleksinin ayrışma sabitidir. Eşitlik 2.8, Eşitlik 2.7'de yerine yerleştirilirse;

$$r = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \frac{[E_o][S]}{K_M' + [S]} = \frac{r_{maks}[S]}{K_M' + [S]} \text{ ifadesi bulunur.} \quad (2.10)$$

Bu durumda maksimum reaksiyon hızı $r_{maks} = k_2[E_o]$ 'dir. Reaksiyon ortamına daha çok enzim eklenirse r_{maks} artar.

2. Yarı-yatışkın durum kabulü

Enzim-substrat reaksiyonu doyumluk kinetiği gösterse bile birçok durumda hızlı denge kabulü geçerli değildir. Deneysel sistemlerin çoğunda başlangıç substrat derişiminin başlangıç enzim derişiminden çok büyük olduğu kapalı bir sistem olan kesikli reaktör kullanılır. Bu sistemlerden $[E_o]$ görece olarak küçük olduğundan, $d[ES]/dt \approx 0$ olarak alınabilir. Eşitlik 2.7' ye yarı-yatışkın durum kabulü uygulandığında;

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} \text{ ifadesi elde edilir.} \quad (2.11)$$

Eşitlik 2.5 Eşitlik 2.10'da yerine yerleştirilir ve bulunan eşitlik (Eşitlik 2.12) düzenlenirse Eşitlik 2.13 bulunur.

$$[ES] = \frac{k_1([E_o] - [ES])[S]}{k_{-1} + k_2} = \frac{[E_o][S]}{(k_{-1} + k_2)/k_1 + [S]} \quad (2.12)$$

$$r = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \frac{[E_o][S]}{(k_{-1} + k_2)/k_1 + [S]} = \frac{r_{maks}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.13)$$

Eşitlik 2.12'de $r_{maks}=k_2[E_o]$ ve $K_M=(k_{-1}+k_2)/k_1$ 'dir (Schuler ve Kargi 1992).

Michaelis-Menten denklemine göre; K_M (Michaelis-Menten sabiti), enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermektedir. K_M değeri küçük olan enzim, substratı için yüksek bir affinite gösterir; enzim düşük bir substrat derişiminde doyararak maksimum hız sağlar. K_M değeri büyük olan enzim, substratı için düşük bir affinite gösterir; enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat derişimi gerekmektedir. Bir enzim için K_M değeri, enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimini karakterize eden bir sabit sayıdır.

Michaelis-Menten denklemi hiperbolik eğrinin denklemi olduğundan ve hiperbolik eğrinin karakteristik noktalarını belirlemek zor olduğundan bir enzime ait r_{maks} ve K_M 'yi deneysel olarak incelemeyi kolaylaştırmak için grafiği doğrusal olan başka denklemler de önerilmiştir.

Michaelis-Menten denklemi doğrusal olmayan bir grafik olduğundan, kinetik katsayıların hesaplanması ancak doğrusal olmayan regresyon hesaplamaları için farklı düzeylerde hazırlanan bilgisayar yazılımları kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bilgisayar yazılımlarının kullanılmasının yanı sıra, kinetik katsayıların hesaplanması amacıyla farklı grafiksel yaklaşımlar da kullanılmaktadır. Doğrusal olmayan regresyon yönteminin haricinde Lineweaver-Burk, Eadie- Hofstee ve Hanes- Woolf grafiksel yaklaşımları en yaygın kullanılan doğrusallaştırma yöntemleridir.

2.18 İnhibisyon Kinetiği (Substrat İnhibisyonu)

Yüksek derişimler, bazı enzimatik reaksiyonlarda inhibisyon etkisi yaratabilirler. Substrat inhibisyon reaksiyonu ve grafiği aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.17).

$$r_p = \frac{r_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.18)$$

Yüksek substrat konsantrasyonların da $[S] \gg K_M$ ise reaksiyon hızı;

Substrat konsantrasyonu $\frac{dr_p}{d[S]} = 0$ noktasında;

$$S_{\max} = \sqrt{K_M K_{S2}} \text{ olarak belirlenebilir (Liu 2013).} \quad (2.19)$$

2.19 Tüm Hücre (Whole Cell) ile Biyodönüşüm

Tüm hücre otomatik olarak metabolik yol izleyebildiğinden dolayı kofaktör rejenerasyonu için kofaktör döngüsüne ihtiyaç duymaz. Mikrobiyal dönüşümlerin verimliliği genellikle düşük olur. Çünkü doğal olmayan substratlar çoğunlukla yaşayan organizmaya toksik etki yaparlar ve düşük konsantrasyonlarda tolere edilebilirler (hacim başına ~% 0.1-0.3).

Son yıllarda, biyokatalizör olarak bitki hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen biyokatalitik reaksiyonlar, bitkilerin sentezlenen kimyasal maddelere göre yan etkilerinin daha az olması ve maliyetlerinin düşük olması nedeni ile dikkat çekmektedir (Giri vd. 2001).

Biyokatalitik tepkimelerin endüstriyel uygulamalarında üç önemli sorun ile karşılaşılır.

1. Birçok enzim, işletim koşullarında yeterli kararlılığa sahip değildir. Bunun nedeni otooksidasyon, kendini parçalama ve/veya çözücü tarafından, çözünerek veya mekanik kuvvetler tarafından koparılarak denaturasyona uğraması ile aktivitesini kaybetmeleridir.
2. Enzimlerin ekonomik uygulamaları için tekrar kullanımlarını sağlamak önemlidir. Enzim molekülleri genellikle suda çözünebildiğinden, sulu sistemlerden geri kazanımı ve ürün ve substrattan ayrılmasının zorluğu sıkça karşılaşılan problemlerdir.

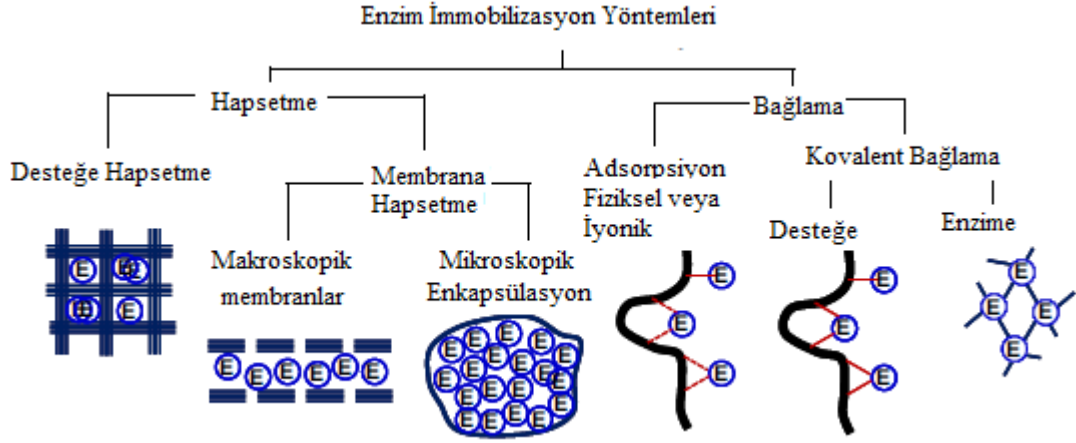
3. Endüstriyel proseslerde verimlilik, işletme süresi kazancı (birim zamanda, birim hacimde, birim katalizör başına üretilen ürün) ile ölçülür. Genellikle biyokatalitik sistemlerde yüksek substrat ve ürün derişimlerinde çalışılmaz (Faber 2000). Bu sorunları çözüme yöntemlerinden biri biyokatalizörlerin tutuklanmasıdır.

2.20 Tutuklama

Endüstride pek çok ürünün sentezi, parçalanması ya da analitik olarak incelenmesine olanak tanıyan kimyasal proseslerde kullanılan konvansiyonel metotlar gelişmeye devam ederken, sadece verimli ve güvenli olmakla kalmayıp, yeniden kullanılabilen, çevreye zararsız, enerji tasarrufu sağlayan alternatif metotlar da hızla araştırılmaktadır. Bu hedeflere ulaşmakta en umut vaat edici olanı ise enzimlerin endüstride kullanımınıdır. Mevcut kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında enzimler pek çok önemli özellik sergilemektedirler. En göze çarpan özellikleri sahip oldukları yüksek katalitik aktivite ve yüksek orandaki özgüllükleridir. Bu özgüllük sayesinde istenen reaksiyonun katalizlenmesi ve de istenen tek bir son ürünün eldesi mümkün olmaktadır. Bu da hem malzeme giderini düşürmeye hem de daha yüksek bir reaksiyon verimine ulaşabilmeye imkân sağlamaktadır (Krajewska 2003).

Tutuklama enzimlerin serbest enzimlere göre en önemli avantajları şu şekilde sıralanabilir;

- Tutuklanmış enzimler tekrar tekrar kullanılabilirler.
- Katalitik aktiviteler için çok daha iyi bir reaksiyon ortamı sağlarlar.
- Ürün kalitesini olumlu yönde etkileyecek alt akım işlemlerinin maliyetini düşürürler (Haider ve Husain 2007).
- Reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilirler.
- Sürekli sistemde kullanıma uygundur.
- Tutuklanmış enzimler, serbest enzimlere göre daha stabildirler (Pessela 2003).



Şekil 2.19 Enzim immobilizasyon yöntemleri (Liu 2013)

2.20.1 Hapsetme

Enzimin, substratın ulaşabileceği bir polimer ya da membran içinde fiziksel olarak alıkonması yöntemidir. Bu yöntem diğer tutuklama yöntemlerine göre, daha küçük substrat ve ürün molekülleri için uygundur. Biyokatalizörler jel veya membrana bağlanmaz. Genellikle farklı boyutlardaki ve özellikteki enzimler ile mikrobiyal hücreler ve organelleri için hemen hemen hiç biyolojik aktivite kaybı olmadan ve enzim özelliklerini değiştirmeden uygulanabilen bir yöntemdir.

Jelde hapsetme yöntemi, çapraz bağlanmış suda çözünmeyen bir polimer zarın boşlukları içerisine enzimin veya hücrenin hapsedilmesidir. İlk uygulamaları poliakrilamid jel içerisine tripsin, papain, β -amilaz ve D-fruktoz bifosfat aldolaz enzimleri ile Bernfeld ve Wan tarafından 1963 de yapılmıştır (Kennedy 1995).

Life hapsetme yönteminde, Dineli tarafından 1972’de mikro boşluklar içeren lifler geliştirilmiştir. Bu metodun jele hapsetmeye göre birkaç avantajı vardır. Çok ince lifler kullanılarak enzimin tutuklanabilmesi için yüksek yüzey alanı sağlanabilir. Lifler zayıf asit ve alkaliye, yüksek iyonik güce, bazı organik çözücülere ve kullanılan polimere bağlı olarak mikrobiyal etkilere karşı dayanıklılık gösterirler. Birden fazla enzimin tutuklandığı çoklu enzim sistemlerinde, seçilen enzim için gerekli düşük molekül ağırlıklı substratlar için sınırlayıcı lifler hazırlanabilir (Kennedy 1995).

Mikrokapsülleme, enzim çözeltisinin yarıçapı 1-100 µm olan yarı geçirgen polimer membranla çevrelenerek hapsedilmesi yöntemidir. Bu tutuklama yönteminde enzimler fiziksel olarak substrat ve ürünlerin kolaylıkla difüzlenebileceği bir membranla çevrilir. Boyalar, ilaçlar ve diğer kimyasallar için kapsülleme kullanılan bir yöntemdir; ancak enzimler için ilk uygulama 1964'de yapılmıştır. Mikrokapsülleme sırasında enzim aktivitesini kaybedebilir. Mikrokapsülleme için yüksek enzim derişimi gereklidir. Membran duvarları enzim içerebilir ve tutuklama sonrası sızıntı olabilir. En büyük avantajı substrat ve enzimin teması için nispeten küçük bir hacim içinde fazla miktarda geniş yüzey alanı yaratılabilmesi ve birçok enzim için tek bir adımda eşanlı tutuklanmasına olanak sağlamasıdır (Kennedy 1995).

Membran biyoreaktörler, Tutuklanmış ya da serbest biyokatalizörün reaktörün bir bölümünde membran yardımı ile hapsedilmesi sağlanır. Membran özellikleri belirlenerek enzim ya da hücrenin hapsedildiği bölüme substratın geçmesi sağlanır. Oluşan ürünler besleme akışkanına geri difüzlendir. Membran biyoreaktörlerin kademe sayısı artırılarak istenen akış şekli sağlanabilir.

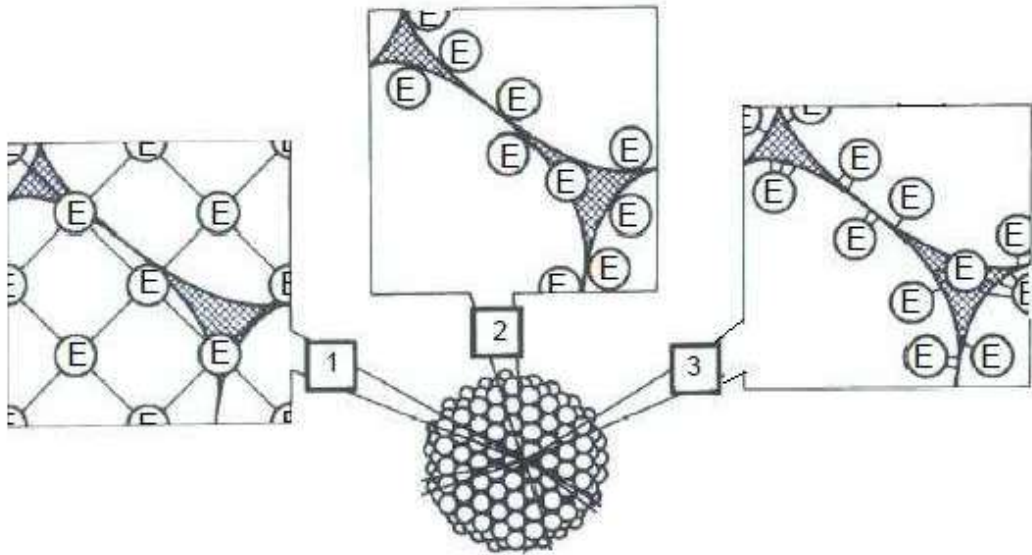
2.20.2 Bağlama

Taşıyıcıya bağlama; enzimin çözünmeyen bir destek üzerine bağlanması, ilk uygulanan ve en yaygın kullanılan enzim tutuklama yöntemidir. Enzimler çözünmeyen destek üzerine fiziksel çekim kuvvetleriyle (hidrojen bağı, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler vb.), iyonik bağlarla, kovalent bağlarla veya metalik bağlarla tutuklanır. Aynı yöntemler hücreler için de kullanılmaktadır. Bu yöntemde en önemli parametre uygun taşıyıcının seçimidir. İdeal destek; substratın enzime bağlanmasını artırır, ürün inhibisyonunu azaltır, optimum pH değerini önemli ölçüde değiştirmez, mikrobiyal etkileri önler ve kolaylıkla rejenere edilerek tekrar kullanılabilmeyi sağlar. Reaktörde kullanılacak taşıyıcı, çözücü içinde kararlı olmalı ve reaksiyon koşullarında bozunmamalıdır. Dolgulu yatak reaktörlerde sürekli işletim için mekanik olarak dayanıklı ve yüksek akış hızı için sıkı doldurulabilmeye uygun olmalıdır. Tutuklanmış enzim medikal cihaz olarak kullanılacaksa bağıışıklık sisteminden cevap almamalı veya pıhtılaşmaya yol açmamalıdır. Enzimin tutuklanmasında organik veya inorganik, doğal

veya sentetik taşıyıcılar kullanılmaktadır. Endüstriyel uygulamalar için inorganik destekler ihtiyacı yeterince karşılarken, medikal kullanım için uygun metakrilat veya silikon kauçuk destekler tercih edilmektedir. Ticari kullanımları çok fazla olan enzimin kolaylıkla tutuklanabildiği organik desteklerle yapılan çalışmalarda boyutsal kararlılığın yetersizliği ve katalizörün rejenerasyonunun kolay olmaması gibi sorunlarla karşılaşılır (Bakkal 2006).

Adsorpsiyon yöntemi ile tutuklamada enzimler, destek materyalleri ile aralarında oluşan, katı faz ile sıvı faz arasındaki ara yüzeyde; Van der Waals kuvvetleri, kuvvetli iyonik bağlar veya hidrofobik etkileşimlerle tutulurlar. Adsorpsiyon yöntemi, tutuklama için en basit tekniklerden biri olmakla birlikte enzimlerin ya da hücrelerin zayıf tutulması ve birim taşıyıcı başına sınırlı miktarda enzim veya hücre adsorbe edebilmesi gibi bazı dezavantajlara sahiptir (Koshcheyenko ve Sukhodolskaya 1985).

Kovalent bağlama yönteminde, aktifleştirilen destek materyal ile enzim arasında kovalent kimyasal bağlar oluşur (Ürküt 2007).



Şekil 2.20 Katı materyal üzerine enzim immobilizasyonunda kullanılan farklı teknikler
1. Adsorpsiyon, 2. Kovalent Bağlanma, 3. Destek Materyalinde hapsetme (Twyman 2005)

İyonik bağlama, iyonik bağlama temelli tutuklama tekniğinde, enzim molekülleri katı desteğin içerdiği iyon değiştirici kalıntılar ile iyonik bağ oluştururlar. Bazı durumlarda

iyonik bağlama ile birlikte fiziksel adsorpsiyon da gerçekleşir. İyonik bağlama ve fiziksel adsorpsiyon arasındaki temel fark enzim ile taşıyıcı arasındaki bağın, iyonik bağlamada çok daha kuvvetli olmasıdır. İyonik bağlama yöntemi fiziksel adsorpsiyon gibi basit bir yöntemdir. Yüksek substrat derişimi, çözeltilinin yüksek iyonik gerilimi veya pH değişimleri gibi bazı durumlarda sızıntı görülebilir. Ancak ılımlı koşullarda kullanımında önemli ölçüde sızma gözlenmez. Tutuklama sırasında küçük derecede yapısal değişimler meydana gelir.

Şelat oluşturma ya da metal bağlama, bu yöntem ile enzimlerin tutuklanması, zirkonyum ve titanyum tuzları gibi geçiş metal bileşikleri ile organik bir taşıyıcının yüzeyinin aktiflenmesi temeline dayanır. Metal bağlama yönteminde, geçiş elementlerinin ligant ile birleşme özelliğinden yararlanır. Taşıyıcıda bulunan hidroksil, amin, tiyol gibi gruplarla ortaklanmamış elektron çifti içeren metallerin kovalent bağ yaparak oluşturduğu kompleks bileşikler, ligantlardır. Örneğin selüloz ve silikadaki hidroksil grupları, metal iyonları ile bağlanabilirler. Benzer şekilde enzimin yapısında bulunan serbest karboksil, hidroksil, alkolik hidroksil ve sülfhidril grupları ligant olarak davranırlar. Böylece metal ile muamele edilmiş taşıyıcı ile enzim arasındaki bağlarla enzim tutuklanmış olur.

Çapraz bağlama, enzimlerin serbest amin ve karboksil gruplarıyla çok fonksiyonlu maddelerin kovalent bağlarla üç boyutlu çapraz bağlanarak enzim kümeleri oluşturmasıdır. Yöntem, enzim molekülleri kendi aralarında bağlandığı zaman çapraz bağlama, albüminler gibi diğer aktif olmayan “dolgu maddeleri” ile bağlanırsa birlikte çapraz bağlama ismini alır. Enzimlerin çapraz bağlanması kolay olmasına rağmen, enzimin üzerindeki fonksiyonel gruplarla özel bağ yapan çapraz bağlama maddesinin seçimi zordur ve genellikle deneysel olarak belirlenir. Yöntemde enzim aktivitesinin iyi bir değerde kalması sağlanırken çözünmeyi önleyen optimum koşullar, enzim derişimi, çapraz bağlama maddesi, pH, iyonik kuvvet, sıcaklık ve tepkime süresi gibi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Bunların yanı sıra enzim yapısı da çözünmeme özellikleri üzerinde etkilidir. L-Lizin bakımından zengin olan proteinler kolayca çözünmez hale getirilebilir. Çapraz bağlama yönteminin en önemli avantajı, hazırlanması için sadece iki veya daha çok fonksiyonlu ve çoğu saf olan maddelerin

kullanılmasıdır. Yöntemin dezavantajı ise aktiviteyi yüksek tutmak amacıyla büyük enzim kümelerini elde etmek için, moleküller arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonun kontrolünün zorluğu ile jel yapısında elde edilen enzim türevlerinin viskoz özellik taşıması nedeniyle geçirgenliğinin zayıf olmasıdır. Bu durum dolgulu kolon reaktörlerde kullanımda basınç yükselmesine neden olur. Aynı zamanda enzimin aktif konumlarında önemli değişmelere neden olur ve difüzyon sınırlamaları getirir. Çapraz bağlama tek başına uygulanan bir yöntem olabildiği gibi genellikle diğer tutuklama yöntemlerinden birini güçlendirmek amacıyla da kullanılır (Tiryaki 1993, Kennedy 1995, Faber 2000).

2.21 Tutuklamada Kullanılan Destek Materyalleri

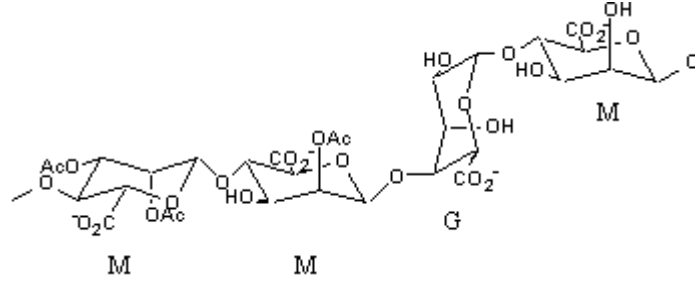
Enzim immobilizasyonunda destek maddesi olarak doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan özellikler; hidrofilik karakter, suda çözünmeme, gözenekli (poröz) yapı, mekanik stabilite ve uygun partikül formu, kimyasal ve termal stabilite, makroorganizmalara karşı direnç, ucuzluk, zehirsizlik, rejenere olabilme gibi özelliklerdir. Ayrıca, kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımalıdır (Telefoncu 1997). Tutuklamada kullanılacak taşıyıcıların bir listesi çizelge 2.2’de görülmektedir.

Çizelge 2.2 Enzim tutuklamada kullanılan taşıyıcılar (Telefoncu 1997)

İnorganik maddeler	Doğal polimerler	Sentetik polimerler
Kil, cam	Selluloz	Polistiren
Silika jel	Nişasta	Poliakrilamid
Bentonit	Dextran	Naylon
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve allil polimerler
Titan dioksit	Karraagenan	Oxiranlar
Zirkonyum dioksit	Kollagen	Metakrilat
Nikel oksit	Kitin ve kitosan	İyon değıştirici recineler
Pomza taşı	Jelatin	Maleik anhidrid
Aktif karbon	Albümin	polimerleri
Metaller	İpek	Polistiren
Metal oksitler	Alginat	Poliakrilamid

2.21.1 Aljinat

Aljinat, *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera* gibi kahverengi yosunlardan elde edilir. Ticari aljinatlar çoğunlukla Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ve Na^+ katyonlarının tuzları şeklinde bulunmaktadır (George and Abraham, 2006). Sodyum aljinat, α -L-guluronik asit ve β -D-mannuronik asit içeren lineer doğal bir polisakkarit olan ve suda çözünebilen aljinik asit tuzudur (Wong 2002). Sodyum aljinatın sulu ortamda Ca, Zn, Sr^{2+} ve Ba^{2+} gibi iki iyonlu katyonların varlığında jel ve jel kürecikleri oluşturduğu bilinmektedir (Wong 2002, George ve Abraham, 2006, Gong 2011).



Şekil 2.21 Alginatın kimyasal formülü

Aljinatın fiziksel özellikleri kompozisyonuna, moleküler ağırlığına ve zincir uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (George ve Abraham 2006). Aljinat gıda sanayinde jel oluşturma kapasitesinin yanında kıvam verici, emülgatör ve stabilizatör olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca FDA tarafından GRAS (generally regarded as safe) grubunda gösterilmiştir. Guluronik asit ve mannuronik asit oranı (G/M) türden türe değişkenlik göstermekte olup farklı mekanik stabilite sağlamaktadır (Vos 2010). G blokları buruşuk şekilde M-blokları ise geniş şerit gibi bir şekle sahiptir. İki G- blok bölgesi yan yana sıralandığında kalsiyum iyonlarının bağlanabileceği boyutlarda ve yapıda kristal şekilde bir delik meydana gelmektedir (George ve Abraham 2006).

Aljinat toksik değildir ve biyokimyasal olarak inerttir. Biyolojik olarak aktif maddelerin enkapsülasyonuna uygundur ve ilaç salınım sistemleri gibi pek çok biyomedikal uygulamada kullanılır. Na^+ gibi monovalent katyonların varlığında çözünür. Ba^{2+} ve Al^{3+} gibi divalent katyonlarla çözünmeyen jel küreciklerini oluşturur. Ba^{2+} ve Al^{3+} iyonlarıyla güçlü çözünemeyen matrisler oluşturur. Ca^{2+} iyonlarıyla jel, film, küre, makrokapsüller oluşturur. Kalsiyum iyonları alginatın mannurik asit ve guluronik asit birimleri için afiniteye sahiptirler. Bu birimlerle reaksiyona girerek kalsiyum-alginat kompleksi oluştururlar. Oluşturulan küreler gözenekli yapıdadır, substratların ve ürünlerin jelden difüzyonuna izin verir (Acar 2009).

2.22 Tutuklu Enzim Kinetiği

Tutuklu enzimler genellikle serbest enzimlere göre daha az aktif olmakla birlikte daha kararlıdır. Tutuklama materyali ile enzim arasındaki etkileşimler tutuklu enzimlerin kinetik davranışlarını önemli ölçüde etkileyebilir. Tutuklama materyalinin hidrofilik ve

hidrofobik yapısı, dielektrik ve yük özellikleri tutuklu enzimin kinetik davranışını etkilemektedir. Optimum pH taşıyıcının yük özelliklerine göre değişebilmesi ve optimum pH aralığı serbest enzimlere göre daha geniş olması bu tür etkileşimlere örnek olarak verilebilir (Chaplin ve Bucke 1990).

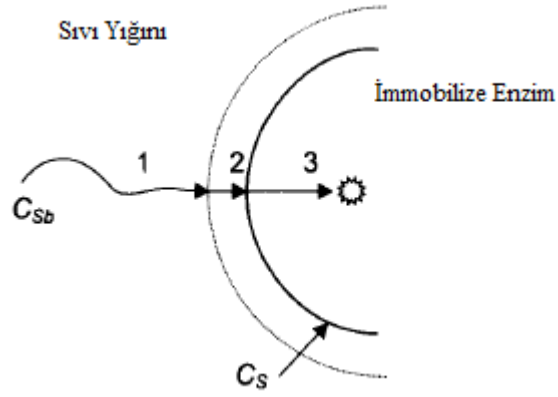
Enzim reaksiyonunun hızı için en önemli etki, substratın yığın ortamdan enzimin mikroçevresine difüzyonudur. Tutuklama sonucu, optimum sıcaklık değeri genellikle artar. Örneğin jel içerisinde hapsedilmiş ya da bir desteğe iyonik veya kovalent bağlama ile tutuklanmış enzimlerin optimum sıcaklık değerleri serbest enzimin optimum değerinden daha yüksektir. Bu durumda, ısı aktarım kısıtlamaları enzimi ısıl bozunmaya karşı korumaktadır. Isı aktarım kısıtlamaları nedeniyle tutuklanmış enzimin mikroçevresinde sıcaklık yığın sıcaklığından daha düşüktür. Tutuklanmış enzimi ısıl bozunmaya karşı koruyan ısı aktarım etkileri daha düşük aktivasyon ve deaktivasyon enerjisine neden olur. Michaels-Menten sabitlerinden K_M değişir, r_{max} ise azalabilir (Tiryaki 1993, Kennedy 1995).

2.22.1 Kütle aktarım dirençleri etkisi

Tutuklanmış enzimler, serbest çözünen enzimlerde olmayan yeni bir probleme neden olabilir. Bu problemler, büyük partikül büyüklüğündeki enzimlerden kaynaklanan kütle aktarım dirençleridir. Substratın, tutuklanmış enzimin sıvısından reaksiyon merkezine doğru izlediği yol, teoriksel olarak, birkaç adıma ayrılabilir;

- 1) Sıvı yığınının, tutuklanmış enzimin çevresindeki sıvı tabakasına aktarım
- 2) Sıvı tabakasından difüzyon
- 3) Partikül yüzeyinden, inert destek malzemesindeki enzimin aktif merkezine difüzyon

İlk iki adım dış kütle aktarım direnci, üçüncü adım ise partikül içi kütle aktarım direncini temsil eder.



Şekil 2.22 İç ve dış yayılım dirençleri şematik diyagramı

2.22.2 Dış kütle aktarım direnci

Tutuklanmış enzim, partikül yüzeyine tutuklanmış ve sadece sıvı yığınının reaksiyonun gerçekleştiği partikül yüzeyine kütle aktarımı söz konusu ise dış kütle aktarımı gerçekleşir. Kütle transfer hızının itici gücü, konsantrasyon farkı vs. ile orantılıdır,

$$N_S = k_S A (C_{Sb} - C_S) \quad (2.20)$$

Burada C_{Sb} ve C_S sırası ile, sıvı yığınınındaki derişim ve immobilize enzim yüzeyindeki derişimi, k_S kütle aktarım katsayısı, A ise partikül yüzey alanı olarak ifade edilir.

Tutuklama sistemlerinin enzimatik reaksiyonlarında, substrat tüketim hızı kütle aktarım hızına eşittir;

$$r_p = k_S a (C_{Sb} - C_S) = \frac{r_{\max} C_S}{K_M + C_S} \quad (2.21)$$

Burada a , hacim başına toplam yüzey alanıdır. Eşitlik, boyutsuz gruplar cinsinden tanımlanabilir.

$$\frac{1 - X_S}{N_{Da}} = \frac{\beta x_S}{1 + \beta x_S} \quad (2.22)$$

burada, $x_S = \frac{C_S}{C_{Sb}}$, $N_{Da} = \frac{r_{\max}}{k_S a C_{Sb}}$, $\beta = \frac{C_{Sb}}{K_M}$ olarak ifade edilir.

N_{Da} , Damköhler sayısı olarak bilinir ve maksimum reaksiyon hızının, maksimum kütle aktarım hızına oranı olarak tanımlanır.

$N_{Da} \ll 1$ ise, maksimum kütle aktarım hızının maksimum reaksiyon hızından büyük olduğunu ve substrat tüketiminde reaksiyon hızının sınırlayıcı faktör olduğunu ifade etmektedir.

$$r_p = \frac{r_{\max} C_S}{K_M + C_S} \quad (2.23)$$

$N_{Da} \gg 1$ ise, kütle aktarım hızı sınırlayıcı faktör durumundadır.

$$r_p = k_S a (C_{Sb} - C_S) \quad (2.24)$$

Reaksiyon hızının, kütle aktarım dirençleri ile azalma derecesini ölçmek için tutuklama sistemlerinde bir etkinlik faktörü tanımlanmıştır,

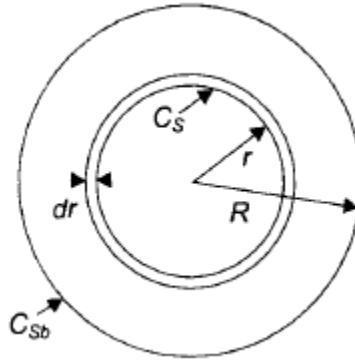
$$\eta = \frac{\text{görünür reaksiyon hız}}{\text{dirençsiz durum hız}} = \frac{\frac{r_{\max} C_S}{K_M + C_S}}{\frac{r_{\max} C_{Sb}}{K_M + C_{Sb}}} = \frac{\beta x_S}{1 + \beta} \quad (2.25)$$

Etkinlik faktörünün β ve x_S 'nin bir fonksiyonu olduğu görülmektedir. Kütle aktarım kısıtlamasının olmadığı durumda, $x_S = 1$ ise, $C_S = C_{Sb}$ ve $\eta = 1$ olacaktır. Kütle aktarım hızının reaksiyon hızına göre çok düşük olduğu durumda, $x_S \approx 0$ ise, $\eta = 0$ olacaktır

2.22.3 Partikül içi kütle aktarım direnci

Enzimler kopolimerizasyon veya mikroenkapsülasyon ile tutuklanıyorsa, partikül içi kütle aktarım dirençleri, enzimatik reaksiyonun hızını etkileyebilir. Kütle aktarım dirençleri etkinliğini belirleyebilmek için çeşitli kabuller yapılırsa;

- 1) Reaksiyonun, tutuklanmış enzimin her yerinde gerçekleştiği ve reaksiyon kinetiğinin serbest enzim ile aynı formda olduğu,
- 2) Kütle aktarımının moleküler difüzyon ile gerçekleştiği,
- 3) Tutuklanmış enzimin dış yüzeyinde kütle aktarım direncinin olmadığı,
- 4) Tutuklanmış enzimlerin küresel olduğu varsayımları ile geliştirilen model “dağıtılmış model” olarak tanımlanır.



Şekil 2.23 Tutuklanmış enzim içindeki bir substrat için kütle denkligi

$$\text{Giriş-Çıkış+Üretim=Birikim} \quad (2.26)$$

$$4\pi \left\{ (r + dr)^2 D_s \left[\frac{dC_s}{dr} + \frac{d}{dr} \left(\frac{dC_s}{dr} dr \right) \right] - r^2 D_s \frac{dC_s}{dr} + (r^2 dr) r_s \right\} = 4\pi r^2 dr \frac{dC_s}{dt} \quad (2.27)$$

Burada, D_s , tutuklama matrisindeki substratın dağılma katsayısı olarak ifade edilir. Yatışkın koşulda substrat derişimindeki değişim, $dC_s / dt=0$ olacaktır. Parantez açıldıktan sonra dr^2 veya dr^3 içeren tüm terimlerin kaldırılması ile ikinci dereceden basit bir denklem elde edilir.

$$D_S \left(\frac{d^2 C_S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_S}{dr} \right) + r_S = 0 \quad (2.28)$$

Eşitlik r_S için uygun kabullerle çözülebilir,

Substrat tüketim hızının sabit olduğu durumda, sıfıncı dereceden reaksiyon kinetiği dikkate alınır,

$$C_S > 0 \longrightarrow r_S = 0 - k_0 \quad (2.29)$$

$$C_S < 0 \longrightarrow r_S = 0 \quad (2.30)$$

Bu yaklaşıma göre, Michaelis-Menten kinetiği için $K_M \ll C_S$ ise $k_0 = r_{maks}$ olacaktır.

$$C_S > 0 \text{ için; } \left(\frac{d^2 C_S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_S}{dr} \right) - \frac{k_0}{D_S} = 0 \quad (2.31)$$

Denklemin çözümü için sınır koşulları aşağıdaki gibi yazılır,

$$\frac{dC_S}{dr} \rightarrow 0 \text{ ise } r \rightarrow R_C \quad (2.32)$$

$$C_S = C_{Sb} \text{ ise } r = R \quad (2.33)$$

Böylece denklem; $\frac{d^2 \alpha}{dr^2} = \frac{k_0}{D_S} r$ halini alır ve r 'ye göre integre edilir,

$$\alpha = \frac{1k_0}{6D_S} r^3 + C_1 r + C_2 \quad (2.34)$$

$$C_S = \frac{1k_0}{6D_S} r^2 + C_1 + \frac{C_2}{r} \quad (2.35)$$

Sınır koşulları uygulandığı zaman; $C_1 = C_{Sb} - \frac{1k_0}{6D_S} R^2 - \frac{1k_0 R_C^3}{3D_S R}$; $C_2 = \frac{1k_0 R^3}{3D_S}$

$$\frac{C_S}{C_{Sb}} = \frac{k_0}{6C_{Sb} D_S} \left[(r^2 - R^2) - 2R_C^3 \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{r} \right) \right] + 1 \quad (2.36)$$

Eşitlik 2.36 sadece $C_S > 0$ için geçerlidir.

$$\left[(R_C^2 - R^2) - 2R_C^3 \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{R_C} \right) \right] + 6 \frac{C_{sb} D_S}{k_0} = 0 \quad (2.37)$$

Dağıtılmış modele göre sıfırıncı dereceden görünür reaksiyon hızı; $\frac{4}{3} \pi (R^3 - R_C^3) k_0$

Difüzyon kısıtlaması olmaksızın reaksiyon hızı; $\frac{4}{3} \pi R^3 k_0$

$$\text{Bu durumda etkinlik faktörü; } \eta = \frac{\frac{4}{3} \pi (R^3 - R_C^3) k_0}{\frac{4}{3} \pi R^3 k_0} = 1 - \left(\frac{R_C}{R} \right)^3 \quad (2.38)$$

Birinci dereceden reaksiyon kinetiğine göre; substrat derişiminin, K_M değerinden düşük olması durumunda birinci dereceden reaksiyonun geçerli olduğuna göre;

$$r_s = -k C_s \text{ olacaktır} \quad (2.39)$$

Eşitlik 2.39 boyutsuz gruplar cinsinden Eşitlik 2.28'de yerine yazılır;

$$\frac{d^2 x_S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dx_S}{dr} - 9\Phi^2 x_S = 0 \quad (2.40)$$

$$\text{Burada, } x_S = \frac{C_S}{C_{sb}}, \bar{r} = \frac{r}{R}, \Phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k}{D_S}}$$

Φ , Thiele modülü olarak ifade edilir. Reaksiyon hızını difüzyon hızına bağlı olarak ölçen bir değişkendir.

Eşitlik 2.40 aşağıdaki sınır koşulları ile $C'_s(r')$ fonksiyonu olarak çözülebilir;

$$\begin{aligned} \bar{r} \rightarrow 0 \text{ ise } x_S \text{ sınırlıdır} \\ \bar{r} = 1 \text{ ise } x_S = 1 \end{aligned}$$

Diferansiyel eşitliği (Eşitlik 2.40), çözülebilir bir forma dönüştürmek için;

$$\bar{\alpha} = \bar{r} x_S \text{ tanımlanır;}$$

$$\frac{d^2 \bar{\alpha}}{dr^2} - 9\Phi^2 \bar{\alpha} = 0 \quad (2.41)$$

Diferansiyel eşitliğin genel çözümü;

$$\bar{\alpha} = C_1 \cosh 3\Phi \bar{r} + C_2 \sinh 3\Phi \bar{r} \quad (2.42)$$

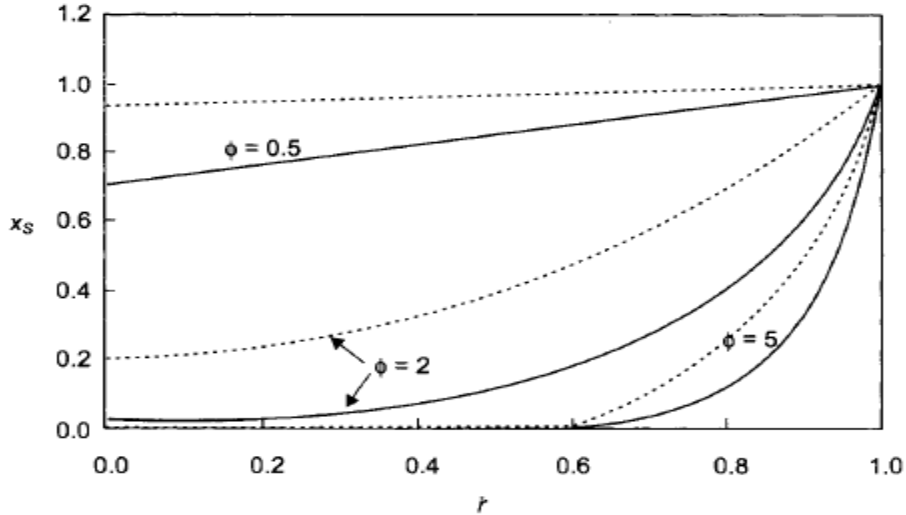
veya,

$$x_S = \frac{1}{r} (C_1 \cosh 3\Phi \bar{r} + C_2 \sinh 3\Phi \bar{r}) \quad (2.43)$$

x_S 'nin sıfıra yaklaştığı durum için C_S sınırlandırılmalıdır. Bu durumda $C_1=0$ kabul edilmelidir. Böylece ikinci sınır koşulu; $C_2 = 1/\sinh 3\Phi$ olacaktır.

$$x_S = \frac{\sinh 3\Phi \bar{r}}{r \sinh 3\Phi} \quad (2.44)$$

Eşitlik 2.44 ve şekil 2.24 tutuklama sistemlerinde substrat derişiminin radyal yönde nasıl değiştiiğini açıklar.



Şekil 2.24 Substrat derişiminin radyal yönde değişimi; (—)1.dereceden ve Michaelis-Menten kinetik, (- - -) farklı Thiele modülü değeri (Φ)

Şekil 2.24'e göre, substrat partikül merkezine radyal yönde hızlıca difüzyonlanır. Öte yandan, yüksek Thiele modülü değeri ($\Phi > 5$), reaksiyon hızı difüzyon hızından

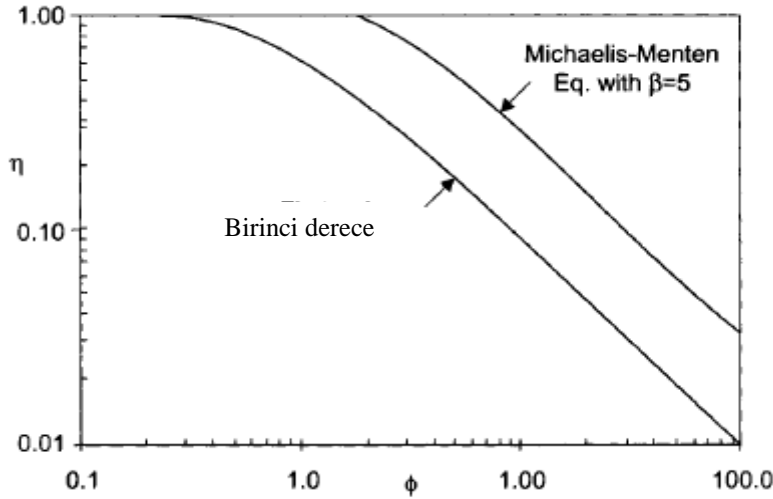
daha fazladır. Böylece, substrat partikül yüzeyine yakın bir yerde tüketilmiş olur. Thiele modülü $\Phi=5$ olduğu zaman, substrat derişimi, $r < 0.6$ noktasında sıfıra yakın olur. Tutuklama sistemlerinde, difüzyon kısıtlamalı hız ile gerçek reaksiyon hızı, kütle aktarım hızına eşit olacaktır.

$$\eta = \frac{\frac{A_p}{V_p} D_S \frac{C_{Sb}}{R} \frac{dx_S}{dr} \Big|_{r=1}}{kC_{Sb}} \quad (2.45)$$

Burada, A_p ve V_p , sırası ile immobilize enzim partikülü yüzey alanı ve hacmi olarak tanımlanır. Eşitlik 2.45'in r 'ye göre diferansiyeli alınır ve yerine yazılır;

$$\eta = \frac{3\Phi \coth 3\Phi - 1}{3\Phi^2} \quad (2.46)$$

Aşağıdaki şekilde, tutuklanmış partiküllerin Thiele modülü (Φ) ve etkinlik faktörü (η) arasındaki ilişki gösterilmiştir (Şekil 2.25).



Şekil 2.25 Küresel partiküller için, Etkinlik katsayısı-Thiele modülü etkileşimi

Thiele modülü 1.dereceden kinetik için $\Phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k}{D_S}}$, Michaelis-Menten kinetik için,

$$\Phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{r_{\max}}{D_S K_M}}$$

Şekil 2.25 incelendiğinde. yüksek Thiele modülü değerlerinde ($\Phi > 3$) substrat difüzyonunun substrat tüketiminden daha yavaş olduğu görülmektedir. Bu tür sistemler difüzyon kontrollü sistemler olup sadece partikülün ince bir tabakasında enzimatik reaksiyon gerçekleşmektedir.

Michaelis-Menten Kinetiğine göre; substrat tüketim hızı Michaelis-Menten kinetiğine göre;

$$r_S = \frac{-r_{maks}C_S}{K_M + C_S} \quad (2.47)$$

şeklinde tanımlanır.

Eşitlik 2.40 boyutsuz gruplar cinsinden yazılır,

$$\frac{d^2x_S}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dx_S}{dr} - 9\Phi^2 \frac{x_S}{1 + \beta x_S} = 0 \quad (2.48)$$

Burada β , boyutsuz Michaelis-Menten Sabiti $\beta = \frac{C_{sb}}{K_M}$ ise 1. dereceden kinetik için

Thiele modülü;

$$\Phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{r_{max}}{D_S K_M}} \quad (2.49)$$

Etkinlik katsayısı katalitik partikül hakkında çok fazla bilgi verse de ne yazık ki etkinlik katsayısı analitik yöntemlerle saptanamamaktadır. Bu nedenle sayısal çözümleme yapılması gerekmektedir. Sayısal çözümleri kolaylaştırmak amacıyla eşdeğer boyutsuz formüller yazılmaktadır. Eşitlik 2.40 lineer olmayan bir diferansiyel eşitlik olduğu için, analitik olarak olmasa da numerik metotlarla çözülebilir. Eşitlik, birinci dereceden iki diferansiyel eşitliğe bölünür ve sınır koşulları uygulanır;

$$\frac{dy}{dr} = \frac{2}{r} \gamma + 9\Phi^2 \frac{x_S}{1 + \beta x_S} = 0 \quad (2.50)$$

$$\frac{dx_S}{dr} = \gamma \quad (2.51)$$

Sınır koşulları;

$$\gamma = 0 \quad \bar{r} = \frac{R_C}{R} \quad (2.52)$$

$$x_S = x_{S0} \quad \bar{r} = \frac{R_C}{R} \quad (2.53)$$

Sınır koşullarını çözebilmek için aşağıdaki varsayımlar yapılabilir;

- 1) $R_C = 0$ olduğu zaman, x_{S0} 'ın değeri $\bar{r} = 0$ da tahmin edilir. Bu durumda substrat küre merkezine ulaşır.
- 2) $R_C > 0$ olduğu zaman, x_{S0} değeri $\bar{r} = R_C/R$ de sifıra eşit olacaktır. Bu durumda substrat küre merkezine ulaşmadan önce tükenir.

Eşitlik 2.45 Michaelis-Menten denklemi için düzenlenir ve etkinlik faktörü;

$$\eta = \frac{\frac{A_p}{V_p} D_S \frac{C_{Sb}}{R} \frac{dx_S}{d\bar{r}} \Big|_{\bar{r}=1}}{\frac{r_{\max} C_{Sb}}{K_M + C_{Sb}}} \quad (2.54)$$

olarak elde edilir.

Eşitlik Thiele modülü cinsinden tekrar yazılırsa etkinlik faktörünü Thiele modülüne bağlayan Eşitlik elde edilir.

$$\eta = \frac{3}{\Phi_1^2} (\Phi_1 \coth \Phi_1 - 1) \quad (2.55)$$

Thiele modülü fiziksel olarak tepkime hızı ile difüzyon hızı oranını ifade etmektedir. Yüksek Thiele modülü, eşzamanlı difüzyon ve tepkime olayında tepkime hızının substrat difüzyon hızına göre daha yüksek olduğunu ve olayın difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Düşük Thiele modülü, substrat difüzyon hızının tepkime hızına göre daha yüksek olduğunu ve olayın kinetik kontrollü olduğunu göstermektedir.

2.23 Biyolojik Jellerin Etkin Difüzyiveleri

Partikül içi kütle aktarım dirençleri analizi, substratın agaroz, agar veya jelatin gibi immobilizasyon matrislerindeki etkin difüzyonunun bilinmesini gerektirir. Jeller, su ve makromoleküllerden oluşan, gözenekli materyallerdir. Jel yapıları difüzyon için yol uzunluğunu arttırdıkları için, difüzyon hızının azalmasına neden olurlar.

Birkaç tipik etkin difüzyivite değeri aşağıda verilmiştir (Çizelge 2.3).

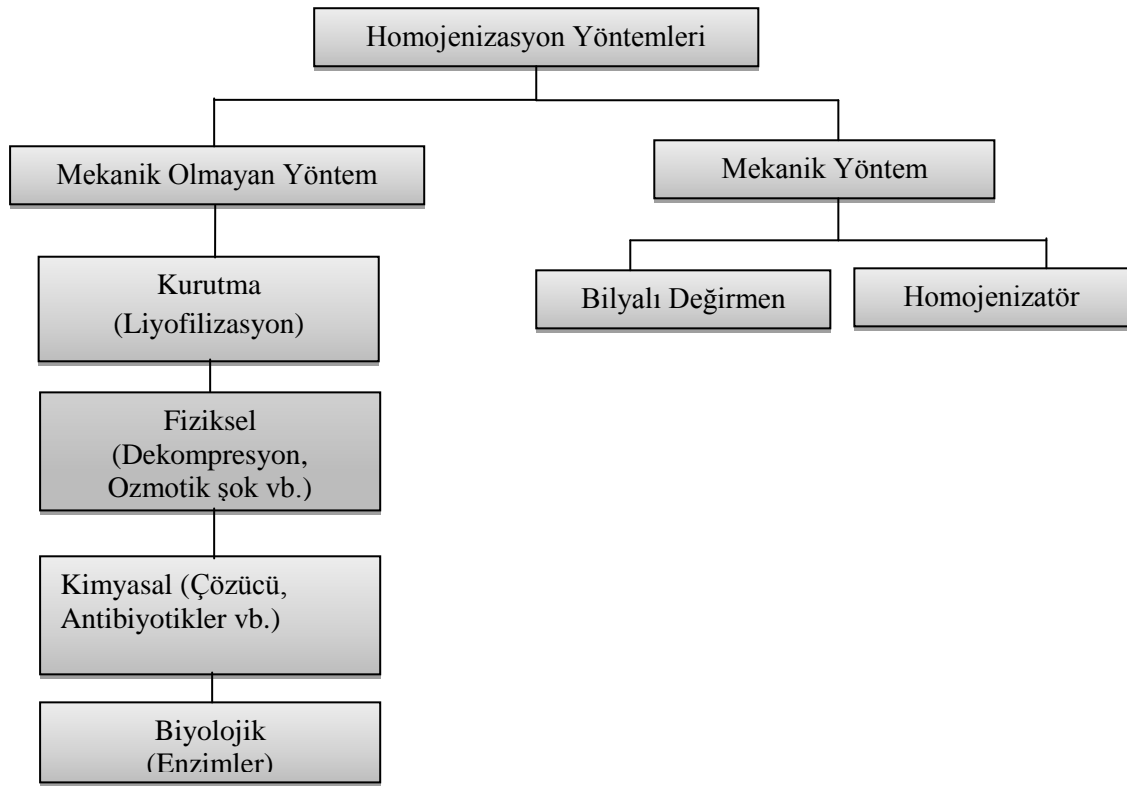
Çizelge 2.3 Sulu çözeltilerdeki jellerin içinde çözünen maddelerin etkin difüzyiveleri (Dutta 2008)

Çözünen madde	Jel	% derişim(%w)	Sıcaklık(°C)	Difüzyivite(m ² /s)
Glukoz	Ca-Aljinat	2	25	6.10x10 ⁻¹⁰
Etanol	Ca-Aljinat	2	25	1x10 ⁻⁹
Sukroz	Jelatin	0	5	2.85x10 ⁻¹⁰
Sukroz	Jelatin	3,8	5	2.09x10 ⁻¹⁰
Sukroz	Jelatin	5,7	5	1.86x10 ⁻¹⁰
Sukroz	Jelatin	7,6	5	1.35x10 ⁻¹⁰
Laktoz	Jelatin	25	5	0.37x10 ⁻¹⁰
L-Triptopan	Ca-Aljinat	2	30	6.67x10 ⁻¹⁰

2.24 Hücrelerin Homojenizasyonu

Çoğu zaman değerli ürün, hücrenin içinde sentezlenir ve hücrenin dışına doğal şartlarda çıkamaz. Bu gibi durumlarda hücre duvarını, değerli metaboliti dışarı alabilecek şekilde çeşitli yöntemler ile parçalamak gerekir.

Bir organel veya molekülü hücrelerden ekstrakte etmek için hücreyi uygun koşullarda parçalama işlemine homojenizasyon denir (Altınışik 2014).



Şekil 2.26 Homojenizasyon için uygulanan teknikler

Hücreleri parçalayarak fraksiyonlarına ayırma yöntemleri, temelde hücre sınırlarının çeşitli fiziksel ya da kimyasal tekniklerle yok edilmesini kapsar. Hücre elemanlarının işlevlerini kaybetmeden parçalanmasını sağlayan çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bir dokudaki çeşitli hücre tiplerini birbirinden ayırmak mümkün olduğu gibi, hücreler de işlevleri bozulmadan organellerine ve/veya makromoleküllerine ayrılabilir. Eğer dikkatli bir uygulama yapılırsa nükleus, mitokondri, kloroplast gibi organeller oldukça

sağlam durumda kalabilir (Ludmil 2002).

2.24.1 Mekanik homojenizasyon yöntemleri

Bu tip tekniklerin en basit olanı, materyali bir havan içinde kum ile öğütmektir. Ezme sırasında alumina, kum ya da cam tozu katılacak olursa parçalama etkinliği artar. Doku veya hücreler (sıvı N₂) sıvı azotta (-196 °C) ya da -20, -70 °C'da dondurularak soğuk havanlarda dövülerek, ezerek parçalama işlemi yapılır. Donmuş olan dokular toz hale gelene kadar kolaylıkla parçalanabilir, ancak işlem dokularda çözünme olmadan kısa sürede bitirilmelidir (Skauen 1976).

Homojenizatör: Hücre süspansiyonuna daldırılan sonikatör, titreşim yaparak, yüksek ses dalgalarıyla hücre bütünlüğünü bozar. Bu amaçla kullanılan aletler (Ultrasonikatör) elektrik enerjisini kesikli karakterde mekanik enerjiye çevirerek, titanyumdan yapılmış sonda yardımıyla ultrases dalgalarını solüsyon içindeki materyale iletir. Bu tür parçalama işlemleri sırasında açığa çıkan ısıyı engellemek için uygun soğutmaların yapılması gerekmektedir.

2.25 Mekanik Olmayan Homojenizasyon Yöntemleri

2.25.1 Kimyasal homojenizasyon

Çözücülerin kullanılması, membran yapısını oluşturan makromoleküllerin çözündüğü uygun bir solvent (çözücü) yardımıyla zar yapısının bütünlüğünün bozulmasıdır. Bu amaçla kullanılan organik çözücüler (örneğin, etil asetat, toluen vb) zardaki lipitleri, deterjanlar ise uygun şartlarda protein ve lipoprotein ile etkileşime girer ve bunlar uzaklaştırılır.

Kimyasal parçalama yöntemleri ısı, yüksek basınç, gürültü gibi olumsuz faktörlerin ortaya çıkmaması gibi nedenlerle fiziksel yöntemlere göre daha çok tercih edilir (Surgun 2009).

2.25.2 Fiziksel homojenizasyon

Fiziksel parçalama dekompresyon, ozmotik şok ve termoliz olarak sınıflandırılabilir. Dekompresyon işleminde hücre süspansiyonu çoğu zaman basınç altında subkritik veya süper kritik gaz ile belirli bir zaman için muamele edilir. Gaz, hücre içine girer, uygulanan basınç ile genişler ve salınım sırasında parçalanmaya neden olur (Fraser 1951). Sistem düşük verimlilik ile çalışmaktadır.

Ozmotik şok işleminde, hücreler öncelikle yüksek ozmotik basınç altında dengeye getirilir ve daha sonra ortam aniden seyreltilir. Su, hızla hücre içerisine girer ve iç basıncı arttırarak lizise neden olur. Teknik öncelikle zayıflatılmış hücre duvarına sahip hücrelere uygulanır. Sistem katılan kimyasal maddelerin yüksek maliyeti ve atıkların yüksek oksijen ihtiyacı nedeni ile genellikle küçük çaplı olarak uygulanmaktadır.

2.25.3 Biyolojik homojenizasyon

Enzimlerin kullanılması: Bu amaçla kullanılan litik enzimler özellikle mikroorganizmalar için uygundur. Gram (+)' lerde bakteri duvarının yıkılması için lizozim enzimi kullanılırken Gram (-)' lerde ise EDTA (kimyasal) uygulamasına tabi tutulması gerekmektedir.

2.26 Kurutma ile Homojenizasyon

2.26.1 Liyofilizasyon

Liyofilizasyon olarak da bilinen dondurarak kurutma biyoteknolojik ürünler, bazı hassas kimyasallar ve ecza endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ayrıştırma işlemidir (Liapis 1994, Sheehan 1998). Dondurarak kurutma yöntemi çok düşük basınç altında donmuş materyalden ya da donmuş çözeltilerden çözücünün (serbest su) süblimasyonla, bağlı suyun uzaklaştırılması (desorpsiyon) işlemidir (Meryman 1960, Perry 1976). Dondurarak kurutma işlemi yavaş ve pahalıdır (Sadikoglu 2003). Ancak kurutma sonunda diğer kurutma teknikleriyle karşılaştırıldığında en kaliteli ürün elde

edilmektedir (Irzyniec 1995). Dondurarak kurutulmuş maddeye tekrar su ilave edildiğinde, büzülmüş ve gözenekli yapısı sayesinde su alarak (rehidrasyon), kurutma öncesi yapısına çok yakın bir yapıya ulaşır (Krokida 1998, Sadıkoğlu 2001). Ürünün raf ömrünün uzaması, ağırlığının azalması, depolama alanından tasarruf ve soğukta saklamaya gerek kalmadan oda sıcaklığında muhafaza gibi avantajları vardır (Duran 2002, Özkara 2003).

Buz kristallerinin büyüklüğü ile materyalde oluşan gözenekli yapı arasında bir ilişki vardır. Kristaller buhar fazına geçince işgal ettikleri kadar hacimde yer boşaltırlar. Küçük kristaller yapıda az ve küçük gözenekler oluştururlar. Buz kristali küçük olduğunda az gözenekli yapı oluşur. Buz çapı büyüdükçe gözenekli yapıda büyür.

Hızlı dondurma işleminde, küçük buz kristalleri oluşur. Küçük buz kristalleri dondurarak kurutmak zordur fakat bunların süblimasyonu materyalin yapısına daha az zarar verir. Yavaş dondurma işleminde, büyük buz kristalleri oluşur. Büyük buz kristalleri dondurarak kurutmak, küçük buz kristallere göre daha kolaydır. Fakat materyalin yapısına daha fazla zarar verir (Özkara 2003). Dondurma işleminin sonunda, başlangıçta sistemde bulunan suyun % 65-90'ı donmuş, geri kalan % 10-35 oranındaki su ise bağlı su (donmamış su) olarak bulunur. Materyali dondurma işlemi ya dondurarak kurutma cihaz içinde ya da başka bir dondurucuda yapılabilir.

2.27 Cevap Yüzey Metodu (RSM)

Kimya Mühendisliğinde optimizasyon, en iyi yanıtı oluşturan prosese uygulanacak koşulların belirlenmesi için kullanılır (Araujo ve Brereton 1996).

Yöntemin uygulanması, yapılan deneylerde kullanılan bağımsız değişkenlerin sonucunda elde edilen cevaplara dayanmaktadır. Bu yöntem uygun deneysel tasarımdan elde edilen nicel veriler ile çok faktörlü modellerin oluşturulması ve benzer şekilde çözümlenmesinde kullanılır. Cevap yüzeyi olarak grafik şeklinde sunulabilen bu modeller; farklı faktörlerin cevabı nasıl etkilediğinin belirlenmesinde, değişkenler

arasındaki ilişkiyi açıklamakta ve cevap yüzeyinin tüm faktörlerinin birleşik etkisini ortaya çıkarmakta kullanılır.

Elde edilebilecek sonuçlar, farklı faktörlerin cevaba nasıl etkidiğini belirlemek, değişkenler arasındaki ilişkiyi açıklamak ve cevap yüzeyindeki tüm faktörlerin bileşik etkisini ortaya çıkarmak şeklinde sıralanabilir (Raymond 1971).

RSM ilk olarak 1951 yılında kimya mühendisliği araştırmalarında optimizasyon çalışmaları amacıyla (Box 1980) tarafından kullanılmıştır. Bu yöntem ile mühendislik uygulamalarındaki bilimsel problemlerin bazı tiplerinin çözümünü istatistiksel olarak yapmak mümkündür. Birden fazla faktörün etkili olduğu sistemlerde tercih edilen bu yöntemin en büyük uygulamaları endüstriyel alanlardır. Yöntemin üç önemli kullanım alanı şunlardır:

- Cevabı etkileyen faktörlere verilen değerlere göre elde edilecek optimum çalışmalar
- Faktörlere verilecek özel değerlere göre cevabın ne şekilde etkilendiğini belirlemeye yönelik çalışmalar
- Cevaptan istenen özelliklerin belirlenmesi ve buna bağlı faktörlerin çalışma aralıklarının saptanması (Box 1980).

Bir sistemde elde edilen sonuç verileri RSM için cevap değerleridir. Cevaplar normalde sürekli ya da kesintili (başta ve sonda) olarak ölçü aletleriyle okunur ve sistemin en önemli fonksiyonudur. Bu yüzden cevapların mümkün olduğunca özenli ve uygun bir ölçme sistemiyle alınması, modelin güvenilirliği açısından önemlidir.

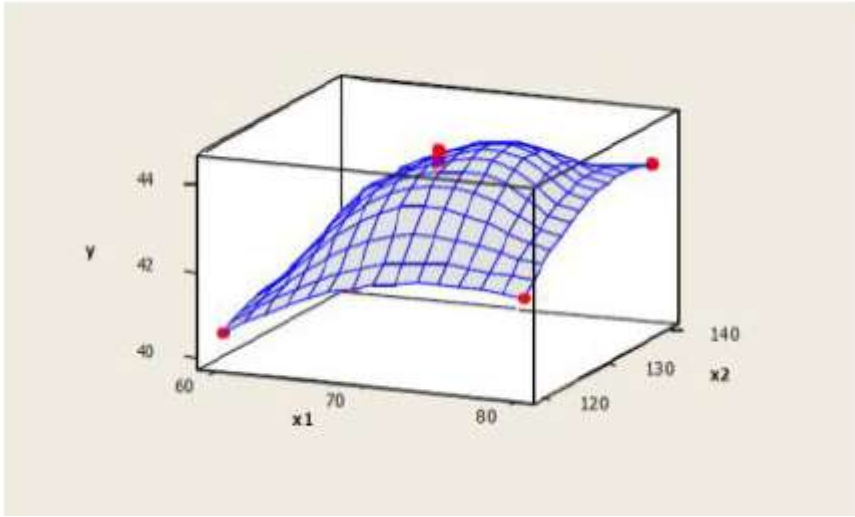
Deneysel sonuçta elde edilen model RSM kullanılarak polinom denklemi şeklinde ifade edilir. RSM’de esas olan iki kısım vardır:

- Deneysel olarak belirlenen faktör değerleri sonucunda elde edilen cevapların matematiksel modelde değerlendirilmesi
- Matematiksel olarak elde edilen modelin istatistiksel olarak analizi

Problemlerin altında yatan mekanizma anlaşılmadığında, deneyleri yapan kişiler bilinmeyen bir fonksiyona empirik bir modelle yaklaşımda bulunmak durumunda kalırlar (Carley 2004). Örneğin, bir kimya mühendisi bir proses verimini maksimize eden sıcaklık (X_1) ve basınç (X_2) seviyesini bulmak istemektedir. Proses verimi sıcaklık ve basınç seviyelerinin fonksiyonudur ve,

$$y=f(X_1, X_2)+e \quad (2.45)$$

Burada e , y cevabında gözlenen hatayı temsil etmektedir. Eğer beklenen cevap $E(y)=f(X_1, X_2)=\eta$ olarak isimlendirilirse; $\eta=f(X_1, X_2)$ ile temsil edilen yüzey, cevap yüzeyi olarak adlandırılmaktadır (Montgomery 2009).



Şekil 2.27. X_1 ve X_2 'nin y 'ye etkisinin cevap yüzey grafiği (Bradley 2007)

Bu grafikte, X_1 ve X_2 'nin her değeri y 'yi oluşturmaktadır. Bu üç boyutlu grafik de cevap yüzey grafiği olarak adlandırılmaktadır (Bradley 2007).

Çalışılan sistemin yanıtını çeşitli değişkenler etkileyebilir ve pratikte bu değişkenlerin sisteme olan küçük katkılarının kontrol edilmesi ve tanımlanması mümkün değildir. Bu nedenle, değişkenleri temel etkilerine göre seçmek gerekir.

Tarama dizaynları, deneysel değişkenlerin ve bunların tekli ve birbirleriyle var olan etkileşimlerinin en önemlilerini belirlemek amacıyla yapılır. Yanıt Yüzey Metodu uygulamasındaki basamaklar aşağıda özetlenmiştir (Bezerra 2008).

1. Tarama çalışmalarına göre sistem üzerinde temel etkileri olan bağımsız değişkenlerin seçilmesi ve deneysel alanın sınırlanması,
2. Deneysel tasarımın seçilmesi ve seçilen deneysel matrise göre deneylerin yürütülmesi,
3. Elde edilen deneysel verilerin matematiksel-istatistiksel uygulamalarının polinom fonksiyonuna uydurulması,
4. Modele uygunluğun değerlendirilmesi,
5. Çalışılan her değişken için optimum değerlerin elde edilmesi.

Yanıt Yüzey Metodunun uygulanabilmesi için deney tasarımı yapılırken bağımsız değişken sayısına bağlı olarak kaç tane deneyin yapılacağından önceden belirlenmesi gerekir. Bunun için aşağıdaki eşitlikler kullanılır,

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad k \leq 5 \quad (2.56)$$

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad k > 5 \quad (2.57)$$

Bu eşitliklerde, N: Deney sayısını, k: Bağımsız değişken sayısını, n_0 : Merkezdeki deney sayısını göstermektedir.

Seçilen bağımsız değişken aralığına bağlı olarak, geliştirilen model düşük ya da yüksek dereceli bir polinom olabilir. Eğer istenen yanıt, bağımsız değişkenlerin değişimi ile doğrusal değişiyorsa, model birinci dereceden bir polinom olur. Bu durum Eşitlik 2.48 ile ifade edilebilir.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon \quad (2.58)$$

Bu eşitlikte, y :Yanıt (bağımlı değişken), β_0 : Sabit terim, β_i : Regresyon katsayısı, X_i : Bağımsız değişken, ε : Deneysel hatadır.

Eşitlik 2.58'de ki bağımsız değişkenler (X_i) doğal birimler cinsinden verilmiştir ancak Yanıt Yüzey Metodunun uygulamasında bu doğal değişkenlerin kodlanmış şekilleri kullanılmaktadır. Eşitliklerde ki doğal değişkenlerin kodlanmış şekle dönüşümlerini göstermektedir.

$$x_i = \frac{(X_i - X_i^o)}{\Delta X_i} , \Delta X_i = X_i^{+1} - X_i^{-1} , X_i^o = \frac{(X_i^{+1} + X_i^{-1})}{2}$$

Bu eşitliklerde; x_i : bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri, ΔX_i : bağımsız değişkenlerin maksimumu ile minimumu arasındaki farktır.

Boyutsuz koordinat sisteminde kodlanmış değişken değerlerinde en yüksek seviye +1, en düşük seviye -1 ve merkez nokta ise 0 ile gösterilir.

Eğer istenen yanıt, sistemde değiştirilen bağımsız değişkenlere göre bir kavisleme içeriyorsa ve aynı zamanda bağımsız parametrelerin yanıt üzerine tekli etkileşimlerinin yanı sıra ortak etkileşimleri de varsa, bu durumda yanıt fonksiyonunu iyi bir uyum için daha yüksek dereceden bir polinom eşitlikle ifade etmek gerekir.

Eşitlik 2.49'da yanıtın ikinci dereceden olduğu ve tekli ve ortak etkileşimlerin gösterildiği matematiksel model verilmiştir (Aksu ve Gönen 2006).

$$y = \beta_o \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_{ij} + \varepsilon \quad (2.59)$$

Burada; β_{ii} : ikinci dereceden terimi, β_{ij} : interaktif terimini ifade eder.

Bu eşitlikteki yanıt ve bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan ilişkilerine göre farklı faktör seviyelerinin kombinasyonlarının oluşturulmasında Design-Expert® programı kullanılmaktadır. Deneysel verilere uygun fonksiyonun bulunmasından sonra modelin geçerliliğini kontrol etmek için kullanılan en güvenilir yol varyans analizi (ANOVA)'dır (Vieira ve Hoffman 1989).

Cevap yüzey yöntemi (CYY) (Response surface methodology), proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntem ile parametrelerin prosese olan etkileri incelenmekte ve bu parametrelerin optimum seviyeleri belirlenmektedir (Myers ve Montgomery 1995).

Cevap yüzey yönteminin avantajları, daha az deney ile daha fazla bilgi elde edilebilmesi ve birden çok parametrenin ve interaksyonlarının etkilerini birlikte inceleme imkânı sağlamasıdır. Bu metotta deneysel veriler matematiksel modeller oluşturmakta kullanılmakta, elde edilen model ile proses için optimum koşullar belirlenmektedir (Ürküt 2007).

2.28 Biyoreaktörler ve Çeşitleri

Biyoreaktör, hücre ve doku kültürlerinde yaşamı destekleyen ve sürdüren bir reaktördür. Yaşamı sürdürmek için gereken tüm hücresel tepkimeler enzimler aracılığı ile olur. Enzimler, kimyasal enerjiye dönüşme ve hücre bileşenlerinin yapımı, bozulması ve sindirimi gibi hücre metabolizmasının çeşitli yönlerini katalizler. Canlı hücrelerin pazarlanabilir kimyasal ürünler üretmek amacı ile kullanılması gittikçe artan bir önem kazanmaktadır. Biosentez ile üretilen birkaç kimyasal madde, tarımsal ürün ve gıda ürünlerinin sayısı belirgin bir şekilde artmıştır. Günümüzde petrolden türetilen birçok organik maddenin gelecekte canlı hücreler vasıtası ile üretileceği beklenmektedir. Ortalama tepkime koşullarındaki biyodönüşümün üstün yanları, yüksek verim, organizmaların bir tepkimede birbirini takip eden adımları katalizleyebilen çeşitli enzimler içermesi ve daha da önemlisi stereospesifik katalizör olarak davranmasıdır (Fogler 1992).

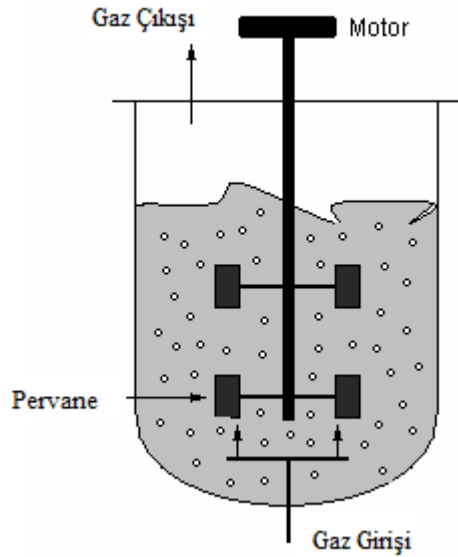
Genel olarak, çoğu biyolojik reaksiyon sistemleri süspansiyon ve tutuklama sistemleri olarak iki ana grupta sınıflandırılabilir: süspansiyon kültürleri için ağırlıklı olarak, karıştırmalı tank, hava-kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörleri, tutuklanmış hücrelerin enzimatik reaksiyon sistemleri için genellikle membran, akışkan yatak ve dolgu yatak biyoreaktörler kullanılır.

Biyoreaktörlerin tasarımı ve seçiminde bazı temel ilkelere dikkat etmek gerekir. Besinler hücrelerine etkili bir şekilde temin edilebilmeli ve yan ürünler uzaklaştırılmalıdır. Hücre büyümesi ve ürün oluşumu kinetiği, optimum çevre koşulları belirlenerek değerlendirilmelidir. Karıştırma, kesme kuvveti ve oksijen transferi de dahil olmak üzere tüm taşıma olayları, biyoreaktör tasarımı ve ölçek-up için gerekli

kriterleri tanımlamak için çalışılmalıdır. Sıcaklık, pH, çözülmüş oksijen konsantrasyonu ve substrat konsantrasyonu gibi işletim parametrelerini kontrol etmek ve izlemek kolay olmalıdır. Buna ek olarak, biyoreaktör, mikroorganizmalarla kirlenmesi durumunda kolayca temizlenebilmeli ve mümkün olduğunca basit ve ucuz olmalıdır.

2.28.1 Karıştırılmalı tank biyoreaktörü

En klasik biyoreaktörler, karıştırılmalı tank biyoreaktörleridir. Şekil 2.28, tipik bir karıştırılmalı biyoreaktörün şematik diyagramını göstermektedir (Wang 2007).



Şekil 2.28 Karıştırılmalı tank reaktörü

Karıştırılmalı tank reaktörleri üstüne bir mekanik karıştırıcı yerleştirilmiş tanktan oluşmaktadır. Kesikli veya sürekli işletim sistemine sahiptirler. Çeşitli reaktörler seri ya da paralel olarak kullanılabilir. Karıştırma derecesi tasarımcının denetimi altında olduğundan karıştırılmalı tank reaktörleri iyi kütle ve ısı aktarımını gerektiren durumlar için son derece uygundur (Sinnot 2009).

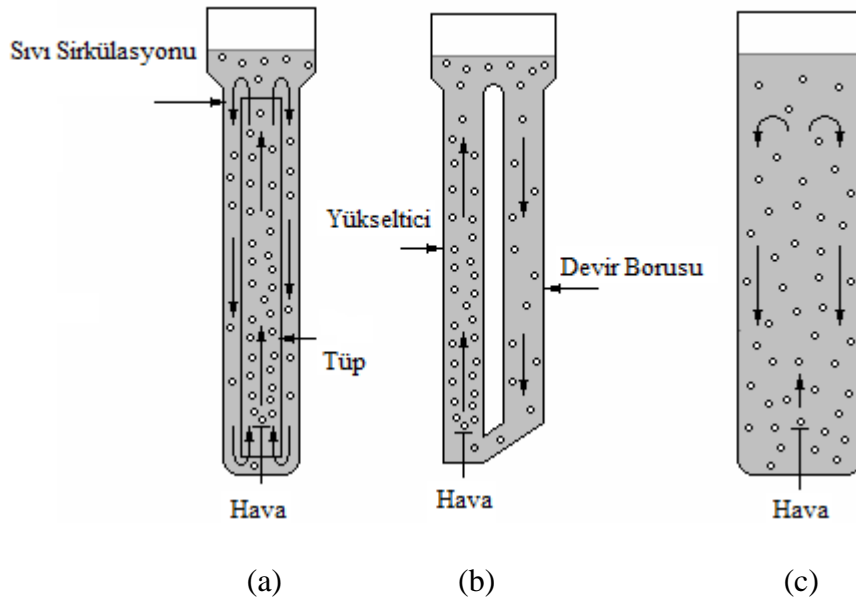
Bitki hücre kültürleri gibi biyolojik sistemlerde, yüksek kesme geriliminden dolayı klasik pervaneler doğrudan uygulanamamaktadır. Hücre yapıları kesme gerilimine ve

biyoreaktör çevresindeki kabarcıklara karşı çok duyarlıdır. Karıştırma hidrodinamiği ve hava kabarcığının neden olduğu ve fiziksel hücre hasarına yol açan, iki temel mekanizma vardır. Birçok araştırmacı, hücre hasarını azaltmak için bu iki mekanizma üzerine çalışmalar yapmış ve genellikle üç çözüm yönteminde birleşmişlerdir;

- 1- Hava kabarcıklarının neden olduğu gerilimi azaltmak için yeni oksijenleme cihazları geliştirilmesi
- 2- Farklı koruyucu maddeler
- 3- Farklı karıştırıcı türleri tasarlama

2.28.2 Pnömatik karıştırımlı biyoreaktörler

Bu biyoreaktörler genel olarak kabarcık kolon ve hava kaldırmalı olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 2.29).



Şekil 2.29 Kabarcık kolon ve hava kaldırmalı pnömatik karıştırımlı reaktörler

Pnömatik karıştırımlı reaktörlerde, kabarcık kolon ve hava kaldırmalı biyoreaktör arasındaki temel fark, akışın reaktör içerisinde bulunan gaz dağıtıcılar yardımıyla sağlanmasıdır.

Tipik bir hava kaldırmalı biyoreaktör içindeki döngüde (a); hava, tüpler içindeki dağıtıcılar vasıtası ile beslenir ve böylece hava kabarcıkları ile sıvının sirkülasyonu sağlanır. Tüpün merkezine doğru akan hava kabarcıklarının bazıları birleşip ve kolonun üstünden çıkarken, diğer kabarcıklar ise, tüpün çevresinden aşağı akan ve gazı alınmış sıvıyı takip ederek döngüye katılırlar

Çeşitli konfigürasyonları ile hava kaldırmalı reaktörler, hücre kültürleri, çeşitli fermantasyon süreçleri ve biyolojik atık su giderimi gibi kullanım alanlarına sahiptirler.

Karıştırmalı tank biyoreaktörlere göre birçok avantajları vardır. Bunlar, hareketli parçaların bulunmaması, yüksek gaz absorpsiyonu etkinliği, iyi ısı aktarım karakteristikleri ve kısa karışma süresi olarak sıralanabilir. Aynı zamanda hava kaldırmalı biyoreaktörler, akışkan akımı bakımından homojen bir yapıya sahiptir (Wang 2007).

Kabarcıklı kolon reaktörler, yapısal ve işlevsel olarak daha basit olması, bu reaktörleri karıştırmalı reaktörlerden ayıran farklardan biridir. Bu reaktörler sıvının içine gazın püskürtülerek verildiği kolonlardan oluşur. İç kısımlarında hareketli parça yoktur. Proses için gerekli karıştırma püskürtülen gazın yardımı ile sağlanır. Kabarcıklı kolon reaktörlerde karışma için gerekli olan oksijen, püskürtülen gazdan sağlanmaktadır.

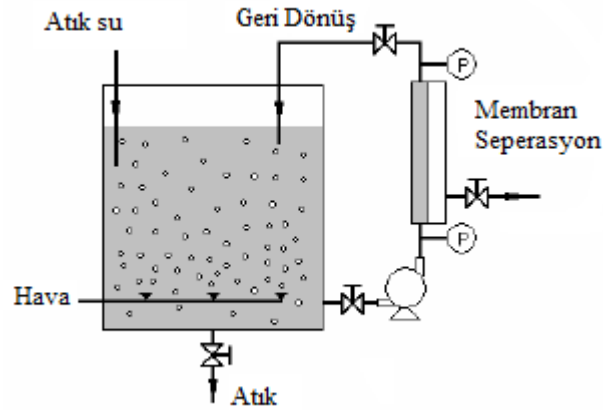
Hava-kaldırmalı biyoreaktörle karşılaştırıldığında, kabarcık kolon biyoreaktörde, vizkoz sıvılardaki kabarcıkların birleşmesi nedeniyle ara yüzey alanının azalması ve sıvı faz içinde sürekli bir geri karışma gibi, önemli dezavantajlar söz konusudur. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, kabarcık kolon biyoreaktörlerin merkezine, çok kademeli delikli levhalar kullanılması şeklinde değişiklikler önerilmiştir. Böylece fazlar arası temas ve kütle aktarım karakterizasyonu artırılır.

2.28.3 Membran bioreaktörler

Genel olarak, içinde ürün veya besleme akımından enzimleri veya hücreleri ayıran bir membran bulunan reaktörlerdir. Bu biyoreaktörlerin en önemli özelliği, enzim veya hücrelerin, reaktör içinde muhafaza edilebilmesidir. Bazı durumlarda membranlar,

hücreler ya da enzimlerin in situ ayrılmasında kullanılmaktadır, böylece üretim ve ayırma tek bir adımda gerçekleştirilir. Membranlar selüloz, asetat ve nitrat dahil olmak üzere, polivinilidendiflorid, polisülfon, polipropilen, politetrafloroetilen (PTFE) ve poliakrilonitril gibi çeşitli malzemelerden yapılır.

Membran biyoreaktörler atıksuların arıtılmasında biyolojik çamurun ayrıştırılmasında ve organik maddelerin gideriminde başarılı sonuçlar vermektedir (Zhang 2006).

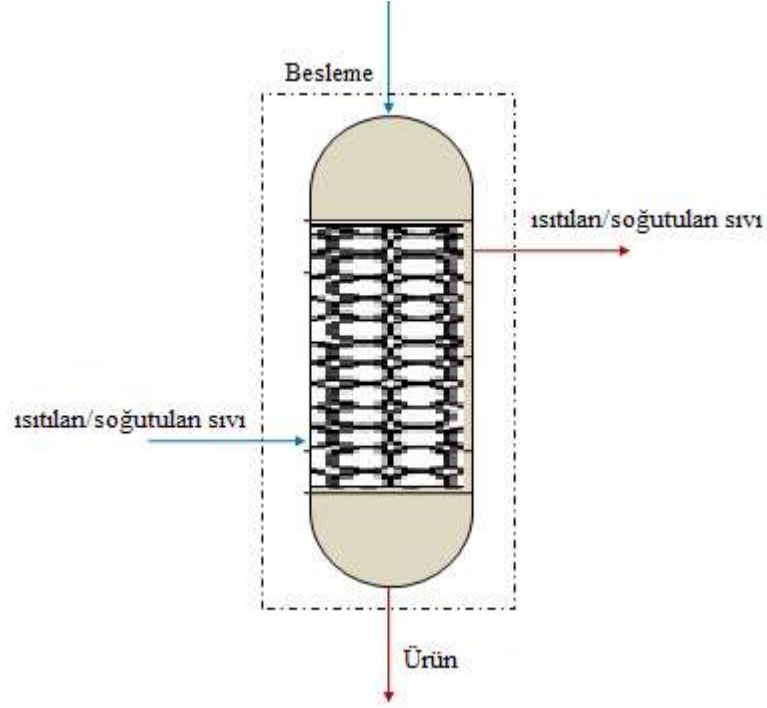


Şekil 2.30 Membran biyoreaktörler

2.28.4 Dolgulu yatak biyoreaktörler

Dolgulu yatak reaktörler, immobilizasyon sistemleri için çok sık kullanılır. Basit işletim koşulları ve yüksek reaksiyon hızı gibi özelliklere sahiptir. Enzim veya hücreler uygun taşıyıcı matrislere hapsedilir ve böylece, yüksek katı-sıvı arayüzey temas alanı ile durgun katı partiküller üzerinden sıvının akış hızı, kütle aktarımı film dirençlerini azaltır.

Kullanılan matrisler, makro-gözenekli mikrot taşıyıcılar, gözenekli seramik küreler, gözenekli cam küreler, cam fiberler ve poliester diskler gibi değişik tipte matrisler kullanılabilir. Bu matrisler hücre yapışması için oldukça geniş yüzeyler oluşturarak aynı zamanda kesme gerilimi gibi mekanik etkilere karşı lokal bir koruyucu çevre oluştururlar (Cong vd. 2001).



Şekil 2.31 Dolgulu yatak biyoreaktörler

Bu biyoreaktörün en önemli dezavantajı ise, düşük sıvı hızlarında, kütle ve ısı transfer katsayılarının nispeten zayıf olmasıdır (Wang 2007).

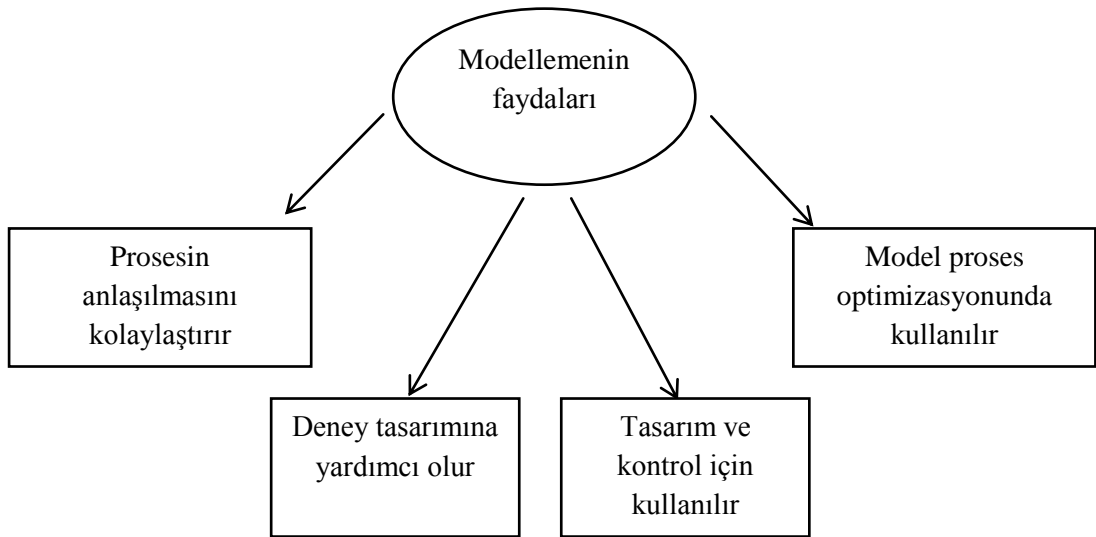
Küçük çaplı kolonların kullanılmasının gerekli olduğu durumlarda her zaman dolgulu kolonlar tercih edilmelidir. Çünkü böyle kolonlara rafların yerleştirilmesi hem zor hem de pahalıdır (Sinnott 2009).

2.29 Kimya Mühendisliğinde Modelleme

Biyolojik proseslerin performansı genellikle ampirik yöntemlerle incelenmektedir. Bu yaklaşımda biyoreaktörün davranışı tüm işletme koşullarında incelenir ve sonuçlardan yeni işletme koşulları için biyoreaktörün performansı tahmin edilir. Bu ampirik yaklaşım prosesin ayrıntıları üzerinde çok az düşünce gerektirir. Uygun görünmesine karşın her türlü proses koşullarını kapsamaları için çok sayıda deney gereklidir.

Modelleme yaklaşımının amacı biyoreaktörün gerçek performansını iyi kurulmuş teoriye dayanarak öngörmeğe çalışmaktır. En önemli değişkenlerin belirlenmesi ve proses üzerine ayrı ayrı etkilerinin incelenmesi gerekmektedir.

Model kurulduktan sonra ortaya çıkan denklemler çözülür ve modelin öngördüğü ile deneysel veriler karşılaştırılır. Eğer ikisi arasında fark varsa model ile deneysel veriler arasında uyum sağlanıncaya kadar model yeniden gözden geçirilir. Modelin deneysel verilerle uyumlu olduğu gösterildikten sonra artık model biyoreaktörün performansını çeşitli işletme koşulları altında öngörmek, yeni proses tasarımı yapmak, optimizasyon ve kontrol için kullanılır. Modelin geçerliliğini doğrulamak için deneysel veri gereklidir. Fakat deney sayısı geleneksel yöntemle göre oldukça azdır. Bunun yanısıra modellemenin en önemli avantajı prosesin daha iyi anlaşılmasını sağlamasıdır.



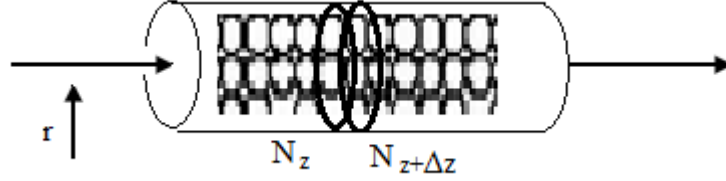
Şekil 2.32 Modellemenin faydaları

2.30 Borusal Reaktörlerde Eksenel ve Çapsal Yönde Değişimler

Borusal reaktörde, yatışkın koşulda, yüzük şeklinde bir hacim elemanı alınarak, akı cinsinden kütle korunum denklemi yazılmıştır.

Birim zamanda Hacim Elemanında z yönündeki değişim
Birim zamanda Hacim Elemanında r yönündeki değişim
Birim zamanda Hacim Elemanında Oluşan-kaybolan
Birim zamanda Hacim Elemanında Biriken

$$(N_z A_z|_z - N_z A_z|_{z+\Delta z}) + (N_r A_r|_r - N_r A_r|_{r+\Delta r}) + (r_T V) = 0 \quad (2.60)$$



Şekil 2.33 Borusal reaktör

$\lim \Delta z, \Delta r, \Delta t \rightarrow 0;$

$$-\frac{\partial N_z A_z}{\partial z} dz - \frac{\partial N_r A_r}{\partial r} dr + (r_T 2\pi r dr dz) = 0 \quad (2.61)$$

Denklem $V=2\pi\Delta r\Delta z$ ile bölünür;

$$-\frac{\partial N_z A_z}{V \partial z} dz - \frac{\partial N_r A_r}{V \partial r} dr + (r_T) = 0 \quad (2.62)$$

$$-\frac{\partial N_z A_z}{A_z \partial z} dz - \frac{\partial N_r A_r}{A_r \partial r} dr + (r_T) = 0 \quad (2.63)$$

$$N_r = -Dr \frac{\partial C}{\partial r} + V_r C \text{ ve } N_z = -Dz \frac{\partial C}{\partial z} + V_z C \text{ ise,}$$

$$-\frac{\partial(-Dz \frac{\partial C}{\partial z} + V_z C) A_z}{A_z \partial z} dz - \frac{\partial(-Dr \frac{\partial C}{\partial r} + V_r C) A_r}{A_r \partial r} dr + (r_T) = 0 \quad (2.64)$$

$$-\frac{\partial V_z C}{\partial z} + Dz \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - \frac{\partial(A_r V_r C)}{\partial r A_r} + \frac{\partial(A_r D_r \frac{dC}{dr})}{\partial r A_r} + r_T = 0 \quad (2.65)$$

r yönündeki konvektif akım ihmal edilir,

$$-\frac{\partial V_z C}{\partial z} + D_z \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + \frac{D_r}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{dC}{dr} \right) + r_T = 0 \quad (2.66)$$

Sıvı faz ve sabit hacimli sistemlerde,

$$-\frac{\partial V_z C}{\partial z} + D_z \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + \frac{D_r}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{dC}{dr} \right) + r_T = 0 \quad (2.67)$$

(1) (2) (3) (4)

(1) numaralı terim; konveksiyonla z yönünde giren ve çıkan akımları

(2) numaralı terim; aksenal yönde değişimi

(3) numaralı terim; radyal yönde değişimi

(4) numaralı terim; tepkime hızını ifade eden terimlerdir.

Değişimin, r yönünde değişiminden çok, z yönündeki değişimi daha önemlidir;

$$-\frac{\partial V_z C}{\partial z} + D_z \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} + r_T = 0 \quad (2.68)$$

Elde edilen bu model eşitliği, ikinci dereceden adi diferansiyel bir eşitlikdir. Denklemin analitik çözümü için, boyutsuz bir şekle sokulmalıdır;

$$\Psi = C_A / C_{A0} \rightarrow d\Psi = (1/C_{A0})dC \quad (2.69)$$

$$\lambda = z/L \rightarrow d\lambda = (1/L)dz \quad (2.70)$$

$$\frac{dC}{dz} = \frac{C_{A0}}{L} \frac{d\Psi}{d\lambda}; \quad (2.71)$$

$$\frac{d^2 C}{dz^2} = \frac{d}{dz} \left(\frac{dC}{dz} \right) = \frac{d}{dz} \left(\frac{C_{A0}}{L} \frac{d\Psi}{d\lambda} \right) = \frac{C_{A0}}{L} \frac{d^2 \Psi}{dz d\lambda} \quad (2.72)$$

$$dz = L d\lambda; \frac{d^2 C}{dz^2} = \frac{C_{A0}}{L^2} \frac{d^2 \Psi}{d\lambda^2} \quad (2.73)$$

Denklem boyutsuz gruplar cinsinden ve birinci dereceden homojen bir sistem için yatışkın koşulda, tekrar yazılırsa;

$$-V_z \frac{C_{A0}}{L} \frac{d\Psi}{d\lambda} + D_z \frac{C_{A0}}{L^2} \frac{d^2\Psi}{d\lambda^2} + r_T = 0 \quad (2.74)$$

Denklem $V_z \frac{C_{A0}}{L}$ ile bölünür ve;

$$-\frac{d\Psi}{d\lambda} + \frac{D_z}{V_z L} \frac{d^2\Psi}{d\lambda^2} + \frac{L}{V_z C_{A0}} r_T = 0 \quad (2.75)$$

$$-\frac{d\Psi}{d\lambda} + \frac{1}{Pe} \frac{d^2\Psi}{d\lambda^2} + \frac{L}{V_z C_{A0}} r_T = 0 \quad (2.76)$$

boyutsuz denklemi elde edilir. Burada, $Pe = \frac{D_z}{V_z L}$, Peclet sayısını ifade eder (Fogler 1992).

Elde edilen denklem dış kütle aktarımı ihmal edilerek, aşağıdaki sınır koşulları ile MATLAB paket programı ile çözülmüştür.

$$z = 0 \text{ da; } \lambda = 0; \Psi = 1; C_A = C_{A0} \quad (2.77)$$

$$z = L \text{ de; } \lambda = 1; \frac{d\Psi}{d\lambda} = 0; \frac{dC_A}{dz} = 0 \quad (2.78)$$

2.31 Kaynak Özetleri

2.31.1 Bitki hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalar

Biyokatalizör olarak mikrobiyal hücre ve bitki hücresinin kullanıldığı bir çalışmada, bitki hücresi olarak havuç, mikrobiyal hücre olarak maya kullanılmıştır (Rao vd. 2007). Çalışmada, pro-kiral ketonları, indanone, tetralone ve hydroxyl trimonoterpene keton asimetrik sentez ile maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ve havuç biyokatalizöründe indirgenmişlerdir.

Taze havuç, yaklaşık 4mm uzunluğunda dilimler halinde keserek ve 10 g taze havuç, 100 mL ve pH 6.5 olan 0.1 mM sodyum fosfat tamponunda süspanse etmişlerdir.

Çalışma hacmi 500 mL'ye ayarlanmış ve ortama 200 mg keton ekleyerek, inkübasyonu oda sıcaklığında ve orbital çalkalayıcıda 150 rpm de gerçekleştirmişlerdir.

Liyofilize *Saccharomyces cerevisiae* (2 g) hücrelerini, pH 6.5 olan 200 mL 0.1 mM sodyum fosfat tamponunda çözerek, sukroz (2 g), pepton (0.5 g), maya özütü (0.2 g) ve MgCl₂/ ZnCl₂ (0.1 g) içeren zengin ortam içinde, 28–37 °C'de 24 saat inkübe etmişlerdir. İnkübasyon süresinin üçüncü saatinde ortama 200 mg aromatik keton eklemiştirler.

Çizelge 2.4 1-indanones biyoindirgenmesi

Havuç				Maya					
Süre	(h)	Dönüşüm	(%)	ee%	Süre	(h)	Dönüşüm	(%)	ee%
6		95		99	8		85		88
18		75		98	20		72		90
20		70		95	24		75		92
28		45		90	72		60		77
24		80		95	48		65		89
24		75		96	48		65		91

Çizelge 2.5 2 Terpenoid ketonların biyoindirgenmesi

Havuç					Maya						
Süre	(h)	Dönüşüm	(%)	ee%	Configuration	Süre	(h)	Dönüşüm	(%)	ee%	Configuration
8		70		99	S	16		40		89	S
10		60		95	S	16		45		91	S
14		50		90	S	24		25		85	S

Çizelge 2.6 Tetralon ketonların biyoindirgenmesi

Havuç					Maya						
Süre	(h)	Dönüşüm	(%)	ee%	Configuration	Süre	(h)	Dönüşüm	(%)	ee%	Configuration
36		45		85	S	96		35		70	S
40		40		70	S	72		30		70	S
62		40		80	S	72		40		75	S

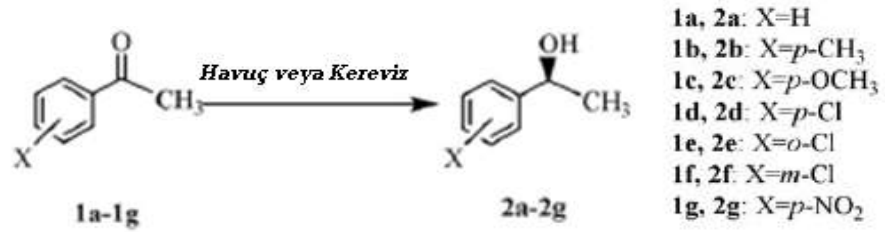
Havuç biyokatalizöründe üç substrat için yüksek dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerleri elde ettiklerini belirtmişlerdir.

2-indanone: 2 saat, % ee 99 % dönüşüm 95

Tetralone: 36 saat, % ee 85 % dönüşüm 45

Hydroxyl trimonoterpene :8 saat, % ee 99 , % dönüşüm 70

Başka bir çalışmada, kereviz ve havucu enzim kaynağı olarak kullanarak asetofenon analoglarının enantiyoseçimli indirgenmesini incelemişlerdir (Xiang vd. 2010).



Şekil 2.34 Kereviz ve havuç tarafından katalizlenmiş 1a-1g'nin enantiyoseçimli indirgenmesi

Çalışmada, taze havuç kökleri ve kerevizlerin dış yüzeylerini temizleyerek, (yaklaşık 5 mm x 5 mm 2 mm) küçük kalınlıklarda kesmişlerdir. Kesilen 10 g havuç için 50 mL saf su, kereviz için 0.1 mol/L fosfat tamponu içinde süspansiyon etmişlerdir. Tepkime ortamına, 50 mg 1a 0.5 mL etanol de çözülerek eklenmiş ve 28 saat, 120 rpm ve 33 °C reaksiyon koşullarında inkübasyon gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra süspansiyon süzerek, etil asetat ile ekstrakte etmişlerdir.

Çizelge 2.7 Kereviz ve havuç tarafından katalizlenmiş 1a-1g'nin %dönüşüm ve %ee değerleri

<i>Substrat</i>	<i>Ürün</i>	<i>Biyokatalizör ve koşullar</i>	<i>Dönüşüm (%)^b</i>	<i>e.e. (%)^b</i>
1a	2a	A	97	96
1b	2b	A	26	99
1c	2c	A	12	99
1d	2d	A	39	95
1e	2e	A	18	94
1f	2f	A	43	96
1g	2g	A	48	93
1a	2a	B	100	99
1b	2b	B	37	99
1c	2c	B	19	99
1d	2d	B	58	92
1e	2e	B	28	90
1f	2f	B	65	93
1g	2g	B	71	94

A: İndirgenme, biyokatalizör olarak havuç kullanılarak 100 mL saf su içinde 28 saat 33 °C de

B: İndirgenme, biyokatalizör olarak kereviz kullanılarak, 0.1 mol/L fosfat tamponunda 28 saat 33 °C de gerçekleştirilmiştir.

Xiang vd. 2010, 1a substratı ile, her iki biyokatalizör içinde yüksek dönüşüm ve ee'nin elde edildiğini belirtmişlerdir. Aromatik halkalarda, özellikle o-lokasyonunda indirgenmenin azaldığını, klor ve nitro gruplarında elektron çekme özelliği daha fazla olduğundan biyokatalizörlerin aktivitesinin arttığını, öte yandan, metil metoksi gruplarının elektron verme özelliklerinin, substrat dönüşümü üzerine zıt bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada daha çok, asetofenon analoglarının biyoindirgenmesi üzerine reaksiyon sıcaklığının etkisi incelenmiştir. Oda sıcaklığı ve 33°C'de denemeler yapmışlar ve sonuçları çizelge 2.8'de göstermişlerdir.

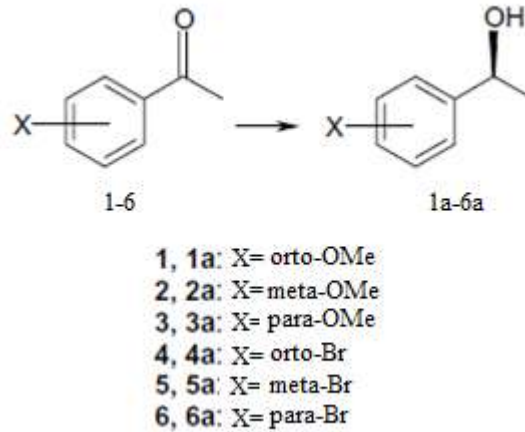
Çizelge 2.8 Kereviz ve havuç tarafından katalizlenmiş 1a-1g'nin sıcaklığa bağlı %dönüşüm

Substrat	Ürün	Reaksiyon sıcaklığı °C	Dönüşüm (%)	
			Havuç	Kereviz
1a	2a	33	97	100
1b	2b	33	26	37
1c	2c	33	12	19
1d	2d	33	39	58
1e	2e	33	18	28
1f	2d	33	43	65
1g	2g	33	48	71
1a	2a	rt. ^a	35	36
1b	2b	rt.	10	12
1c	2c	rt.	5	6
1d	2d	rt.	14	20
1e	2e	rt.	6	9
1f	2d	rt.	15	21
1g	2g	rt.	16	22

a: oda sıcaklığı

Analiz sonucunda; 33 °C'de, 1a substratı ile havuç ; % ee 96 % dönüşüm 97, kereviz; % ee 99 % dönüşüm 100 değerleri elde etmişlerdir.

Wanda vd. (2004), kereviz ve havuç enzim sistemlerini kullanarak bromo ve methoxyasetofenon türevlerinin enantiyoseçimli indirgenmesini incelemişlerdir.



Şekil 2.35 Ketonların havuç ve kereviz ile biyoindirgenmesi

Çalışmada, taze bitkileri elektrikli mikserde 2 dk parçalamış ve 20 ml lik sebze karışımını 0.1mM fosfat tamponunda havuç için pH=6.5 ve kereviz için pH=6.2

süspanse etmişlerdir. Bu karışım ile 20-30 mg 0.5 mL asetonda çözülmüş substratı 48 saat inkübe ederek, kloroform ile ekstrakte etmişlerdir. Biyoindirgenme sonuçlarını çizelgede göstermişlerdir.

Çizelge 2.9 Kereviz ve havuç tarafından katalizlenmiş % dönüşüm ve % ee değerleri

Substrat	Deney	Keton Dönüşümü %ee ve %c	
		Havuç	Kereviz
1 (o-OMe)	1	11/78	
	2		10/87
2 (m-OMe)	3	100/100	
	4		100/98
3 (p-OMe)	5	12/88	
	6		10/87
4 (o-Br)	7	8/100	
	8		27/100
5 (m-Br)	9	54/91	
	10		40/86
6 (p-Br)	11	41/95	
	12		30/88

Çizelge 2.9'a göre, meta pozisyonunda elektron çekme veya almanın önemli olmadığını ayrıca, 2. ve 5. substratta dönüşüm ve ee oranlarının yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Temel olarak substrat lokasyonunun önemi üzerine çalışmışlardır.

Havuç için meta lokasyonu; % 100 ee, % 100 dönüşüm, kereviz için meta lokasyonu; % 100 ee, % 98 dönüşüm değerlerini elde etmişlerdir.

Manihot dulcis-escilanta ve farklı bitki türleri (havuç, patlıcan, patates, gölevez) kullanılarak, keton ve aldehytlerin biyoindirgenmesi üzerine çalışmışlardır (Luciana vd. 2006). Bir dizi alifatik ve aromatik aldehyt ile iki ketonu, manihot köklerinden hazırlanan bitki hücrelerini kullanarak indirgemişlerdir.

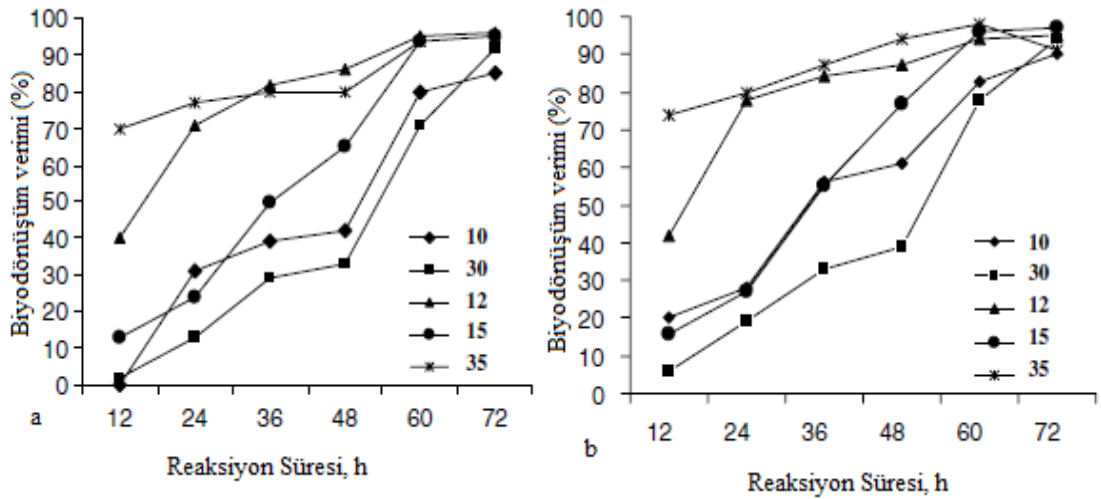
Çalışmada, % 5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde ve sonra saf suda sterilize edilerek ve 140 mL su içinde süspanse edilen, 20 g *M.esculenta* ve *M.dulcis* hücrelerini, 200 mg keton eklenmesi ile oda sıcaklığında 72 saat, 160 rpm de inkübe etmişlerdir.

Süspansiyonu süzerek, etil asetat ile ekstrakte ederek, organik fazı sodyum sülfat ile kurutarak, kalıntıyı silika jel kolonda kloroform ile saflaştırmışlardır.

Çalışmada, asetofenon kullanılarak, *Manihot dulcis-escilanta* ve farklı bitki türleri ile yapılan biyoindirgenme deneylerine en iyi sonucu *manihot* bitkisinin verdiğini belirtmişlerdir.

Çizelge 2.10 *Manihot dulcis-escilanta* ve farklı bitkiler ile elde edilen % ürün verimi

Bitki	% ürün verimi
Patlıcan	42.1
Manihot Dulcis	85.5
Manihot Esculanta	89.3
Havuç	46.3
Gölevez	55.8
Patates	42.6



Şekil 2.36 Ketonların ve aldehidlerin biyodönüşümü: Asetofenon **1**, hexan-3-one **18**, benzaldehit **3** ve sinamaldehyt **7**, karşılık gelen alkoller: 1-fenil-etanol **10**, heksan-3-ol **30**, benzil alkol **12**, sinamil alkol **15**, ve butirik asit **35**

a: *M. esculanta* b: *M. dulcis*

Şekil 2.36'da da görüldüğü gibi, maksimum biyodönüşümün 3 gün (72 h) sonra elde edildiğini belirterek, çalışmada kullanılan tüm substratların (hexan-3-one **18**,

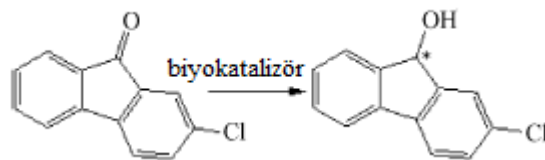
cyclopentanone **19**, cyclohexanone **20**, pulegone **21**, carvone **22**, sitoster-3-one **23**, and cholestan-3-one **24**, ethyl butyrate **25**, ethyl benzoate **26**, β -keto-ester **27**, benzonitrile **28**, benzamide **29**) her iki bitki türü için % dönüşüm ve % ee sonuçlarını çizelge halinde göstermişlerdir.

Çizelge 2.11 Her iki bitki türü için % dönüşüm ve % ee değerleri

Ürün	Biyodönüşüm (%) ¹ H NMR/GC		% ee	
	<i>M. esculenta</i>	<i>M. dulcis</i>	<i>M. esculenta</i>	<i>M. dulcis</i>
10	84.0/80.0	87.0/83.0	>95.0	>97.0
11	88.0/85.0	89.4/87.0	>94.0	>96.0
12	90.5/91.0	85.2/83.0		
13	100.0/87.6	98.6/94.0		
14	100.0/86.0	100.0/94.5		
15	100.0/94.0	100.0/96.5		
16	94.6/80.0	100.0/85.5		
17	95.1/90.0	93.1/90.0		
30	100.0/97.5	100.0/96.7	>93.0	>96.0
31	100.0/92.3	100.0/93.4		
32	100.0/97.3	100.0/91.7		
33	19.2/12.6	13.8/14.9	>96.0	>98.0
34	13.4/11.5	14.1/12.5	>96.0	>97.0
35	/94.1	/91.5		
36	30.2/35.3	48.5/35.5		
37	70.4/79.1	99.2/95.4	>97.0	>98.0

Çizelge 2.11'de de görüldüğü gibi, *M.dulcis* için % ee > 98 ve % dönüşüm > 95 değerlerini elde ederek, aldehytlerin ketonlara göre daha reaktif olduğu belirtilmiştir.

Yang vd. (2009), fluorenonların, yüzey aktif maddelerin sulu çözeltilerinde, meyve ve sebzeler tarafından enantiyoseçimli olarak indirgenmesini araştırmışlardır.



Şekil 2.37 2-kloro florenonun biyokatalizörler ile enantiyoseçimli indirgenmesi

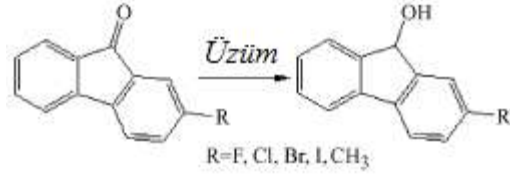
Elma (*Malus pumila* Mill.), Muz (*Musa Colla balbisiana*), Portakal (*Citrus reticulata* Blanco.), Patates (*Solanum tuberosum* L.), Çilek (*Fragaria ananassa* Duch.), Soğan (*Allium fistulosum* L. var.), Erik (*Prunus spp.*), Sarımsak (*Allium sativum* L.), Soğan (*Allium cepa* L.), Kiraz (*Prunus pseudocerasus* Lindl.), Hünnap (*Hünnap* Mill.), Topinambur (*Jerusalem artichoko*) ve Üzüm (*Vitis spp.*) dahil olmak üzere tüm taze meyve ve sebzeleri öncelikle dezenfekte etmiş ve daha sonra sıvı azot içinde toz haline getirerek, 40 g almış ve pH=7.5 20 mM Tris tamponunda süspanse etmişlerdir. 50 mM florenonu 1 mL DMSO içinde çözerek tepkime ortamına eklemişlerdir. Ayrıca SDS, Tween-20 ve Triton X-100 gibi yüzey aktif maddelerini çeşitli derişimler de tepkime ortamına eklemişlerdir. İnkübasyon koşullarını 2 gün, 30 °C ve 170 rpm olarak belirlemişlerdir. Reaksiyonlar tamamlandıktan sonra süzöntüyü etil asetat ile ekstrakte ederek analize hazırlamışlardır.

Çalışmada, biyoindirgenme tepkimesi için, surfaktan derişimi, sıcaklık, reaksiyon süresi ve pH gibi optimum koşullar değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.12 2-kloro florenonun biyokatalizörler ile enantiyoseçimli indirgenmesi

Biyokatalizör	% dönüşüm	% ee
Elma (<i>Malus pumila</i> Mill.)	69	90
Muz (<i>Musa Colla balbisiana</i>)	30	46
Portakal (<i>Citrus reticulata</i> Blanco.)	15	43
Patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	7	50
Çilek (<i>Fragaria ananassa</i> Duch.)	37	93
Soğan (<i>Allium fistulosum</i> L. var.)	13	72
Erik (<i>Prunus spp.</i>),	100	50
Soğan (<i>Allium cepa</i> L.)	8	26
Kiraz (<i>Prunus pseudocerasus</i> Lindl.)	4	87
Hünnap (<i>Hünnap</i> Mill.)	88	28
Topinambur (<i>Jerusalem artichoko</i>)	100	76
Üzüm (<i>Vitis spp.</i>)	97	99
Sarımsak (<i>Allium sativum</i> L.)	-	-

Biyokatalizör olarak Elma (*Malus pumila* Mill.) seçerek beş farklı florenonun enantiyoseçimli biyoindirgenmesini gerçekleştirmişlerdir.

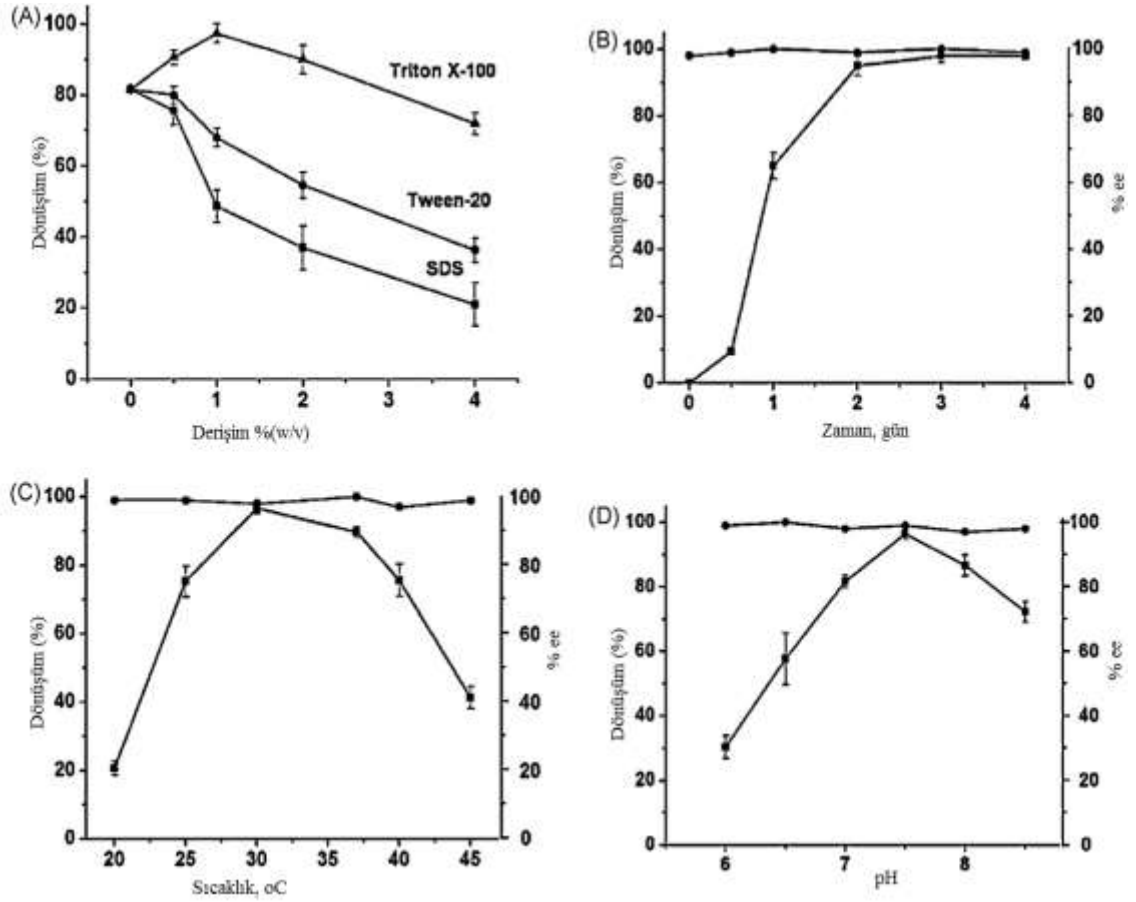


Şekil 2.38 Farklı florenonların, üzüm biyokatalizörlüğünde enantiyoseçimli indirgenmesi

Çizelge 2.13 Elma biyokatalizörü ile beş farklı florenonun enantiyoseçimli biyoindirgenmesi

Bileşik	% dönüşüm	% ee
1	>98	>99
2	>97	>99
3	95	>99
4	91	92
5	>98	74

Biyokatalizör olarak Elma (*Malus pumila Mill.*) ve substrat olarak 2-kloroflorenonu kullanarak enantiyoseçimli biyoindirgenmeye çeşitli parametrelerin etkisini incelemişlerdir (Şekil 2.39).



Şekil 2.39 2-kloroflorenonun, Elma (*Malus pumila Mill.*) biyokatalizörü ile enantiyoseçimli biyoindirgenme tepkimesine faktör etkileri

- A: İyonik olmayan yüzey aktif maddeler
- B: Reaksiyon süresi
- C: Sıcaklık
- D: pH

Çalışmada, enantiyomerik olarak saf florenollerin, bitkiler tarafından hazırlanmasına yönelik etkili bir yöntem geliştirdiklerini ifade etmişlerdir. Ilımlı ve çevre dostu koşullar altında; 30 °C, 170 rpm, % 1 (w/v) Triton X-100, pH=7.5 ile prokiral florenonun % 97' sini % 99 ee ile 2 günde üzüm biyokatalizörü varlığında kiral floronole indirgemişlerdir.

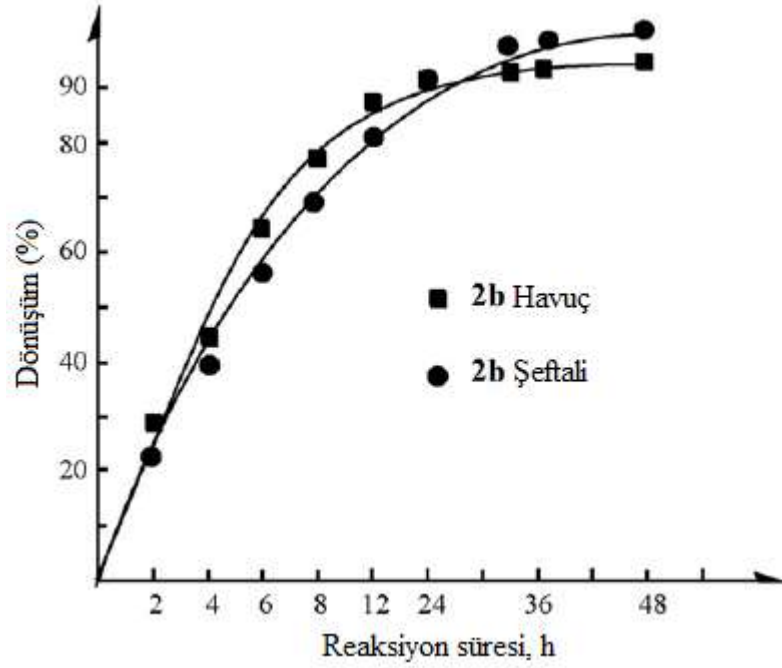
Cui vd. (2008), polisiklik aromatik ketonların, bitki (domates, salatalık, kereviz, üzüm, sarımsak, soğan, elma, şeftali, patlıcan, portakal, havuç, kivi, armut, hurma ve muz) biyokatalizörlüğünde asimetric olarak biyoindirgenmesini gerçekleştirmişlerdir. Taze bitkiler 2 dk elektrikli mikserden geçirilerek 50 g tartılır ve 100 mL su içinde süspansiyon edilmiştir. 50 mg substratı tepkime ortamına eklenerek 30 °C'de inkübe etmişlerdir.

Belirtilen reaksiyon koşulları ve biyokatalizörler ile yapılan deney sonuçlarını çizelge halinde göstermişlerdir.

Çizelge 2.14 Polisiklik aromatik ketonların, bitki biyokatalizörlüğünde indirgenmesi

Biyokatalizör	% c (dönüşüm)	% ee (enantiyomerik aşırılık)
Domates(<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	93	43
Salatalık(<i>Cucumis sativus</i> L.)	68	<5
Kereviz (<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>Rapaceum</i>)	95	<5
Üzüm (<i>Vitis vinifera</i> L.)	15	-
Sarımsak(<i>Allium sativum</i> L.)	23	-
Soğan(<i>Allium cepa</i> L.)	97	11
Elma (<i>Malus pumila</i> Mill)	88	33
Şeftali(<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch)	98	71
Patlıcan(<i>Solanum melongena</i> L)	0	-
Portakal(<i>Citrus reticulata</i> Blanco)	87	19
Havuç (<i>Daucus carota</i> L.)	95	81
Kivi (<i>Actinidia chinensis</i> Planch)	48	13
Armut (<i>Pyrus pyrifolia</i> (Burm.) Nak)	34	25
Hurma (<i>Diospyros kaki</i> L.)	37	23
Muz (<i>Musa paradisiaca</i> L.)	12	-

Enantiyoseçimliliğin ve dönüşümün yüksek olduğu, havuç ve şeftali olmak üzere sadece iki bitki biyokatalizörü olduğunu gözlemlemişlerdir.



Şekil 2.40 Havuç ve şeftali biyokatalizörlüğünde indirgenme

Çalışmada, polisiklik aromatik ketonların asimetrik biyoindirgenmesini, bitki hücrelerinin enzimatik sistemleri ile gerçekleştirmişlerdir.

Chen (2010), 3-okso-3-fenil-propiyonik asit etil esterlerinin, organik çözücü ve fosfat tamponunda, biyokatalizör olarak beyaz turplar kullanılarak asimetrik indirgenmesi üzerine çalışmışlardır. Etil (S)-3-hidroksi-3-fenilpropiyonatın, antidepresan ilaç olan olan (S)-fluoksetin sentezinde önemli bir kiral yapıtaşı olduğunu belirtmişlerdir. Sterilizasyon işleminden sonra turpları (1x1x1mm) boyutunda keserek MS katı besiyeri ortamına 2,4-diklorofenoksi asetik asit ve 0.5 mg/L kinetin ile eklemişlerdir. 18 gün sonra oluşan callusları sıvı besiyerine aktarmıŐ ve 27 C ve 100 rpm de inkübe etmişlerdir.

İnkübasyon sonrası elde edilen hücreleri 2 g kuru ağrılık olarak tartarak, 0.2 M, 30 mL, pH=7 fosfat tamponunda süspanse etmişlerdir. 3 -okso-3-fenil-propiyonik asit etil esteri (0.108-0.846 mmol) tepkime ortamına ekleyerek 10-15 gün inkübe etmişlerdir.

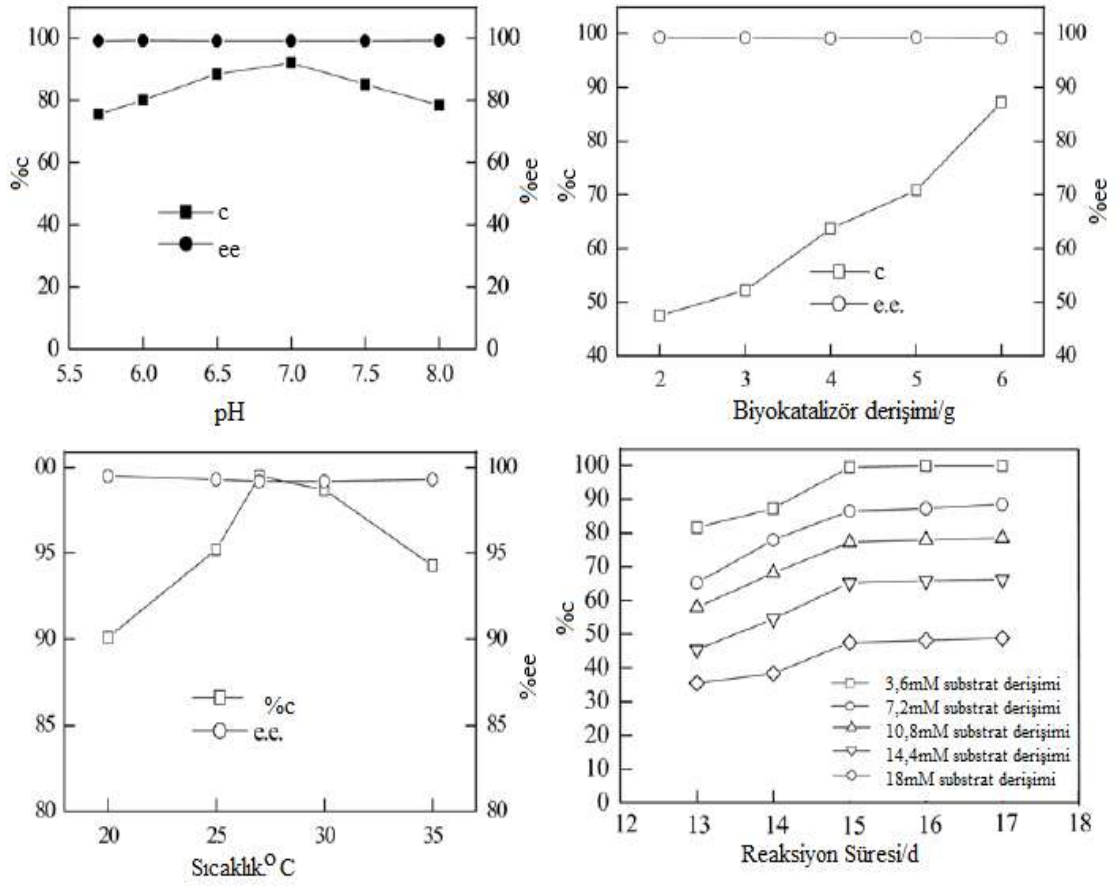
Aynı çalışmada süspansiyon ortamına, n-hekzan, siklohekzan, n-heptan, n-oktan, dodekan, benzol, toluol, etil asetat, propanol, izopropanol ve n-butanol gibi organik çözücüler ekleyerek biyoindirgenme gerçekleştirmişlerdir.

Çizelge 2.15 Farklı ortamlarda 3 -okso-3-fenil-propionik asit etil esterinin indirgenmesi

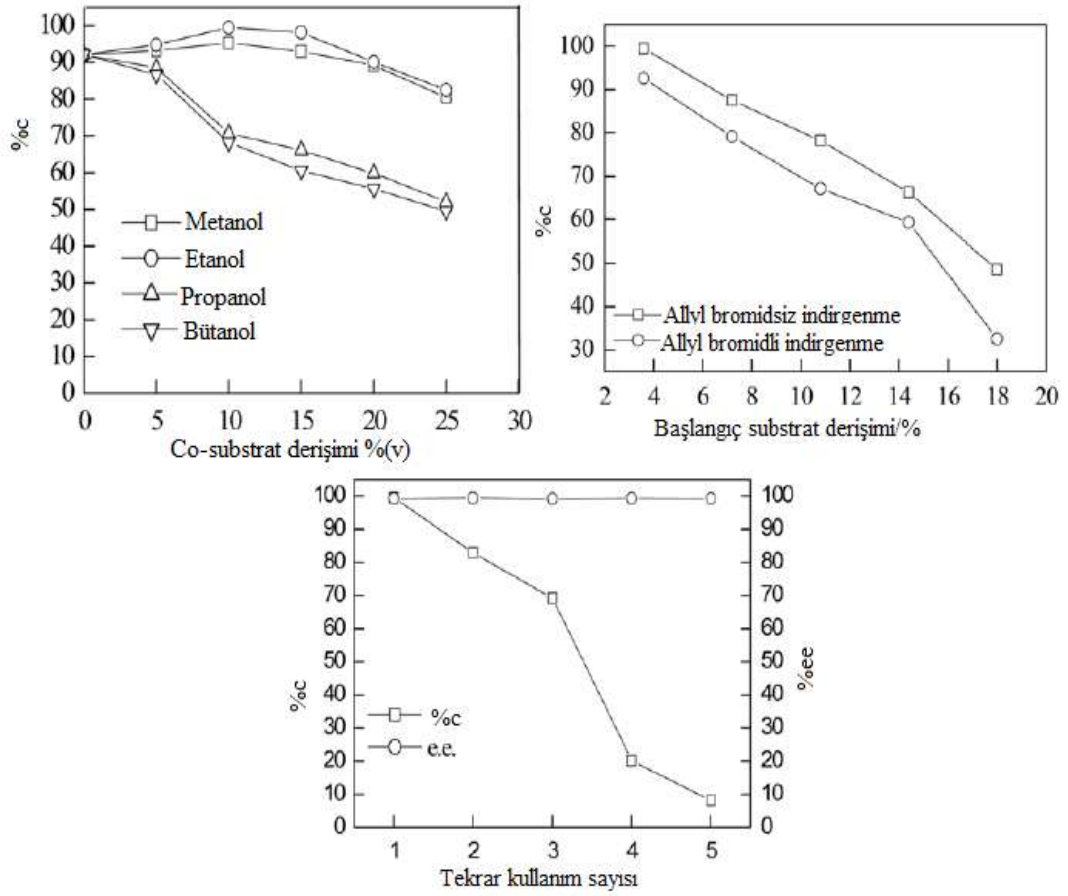
İndirgenme ortamı	Organik çözücü Log P	%dönüşüm	%ee
Fosfat tamponu	/	96.2	95.8
Tampon/n-hekzan	3.4	62.7	96.2
Tampon/siklohekzan	1.5	50.4	96
Tampon/n-heptan	4	72.8	97.3
Tampon/n-oktan	4.5	83.2	98.2
Tampon/n-dodekan	6.6	92.1	99.2
Tampon/n-benzen	2	0	/
Tampon/toluol	2,5	0	/
Tampon/etil asetat	0.68	0	/
Tampon/propanol	0.28	0	/
Tampon/izopropanol	0.28	0	/
Tampon/n-bütanol	0.8	0	/

Çizelge 2.15’de de görüldüğü gibi, süspansiyonun organik çözücü varlığında gerçekleşmesinin, dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerlerini olumlu yönde etkilediğini gözlemlemişlerdir. Organik çözücülerin Log P değerinin artmasının dönüşümü olumlu etkilerken, benzen ve toluol çözücülerinin bitki hücrelerine toksik etki yarattığını belirtmişlerdir.

Çalışmada ayrıca, başlangıç substrat derişimi, reaksiyon süresi, pH ve sıcaklığı, kosubstrat etkisi ve biyokatalizörün tekrar kullanımı gibi parametreler araştırılmıştır (Şekil 2.41).



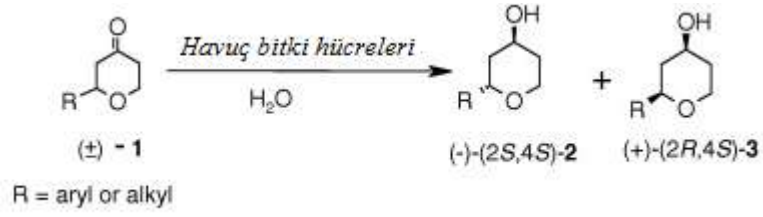
Şekil 2.41 Reaksiyon süresi, pH, başlangıç substrat derişimi etkisi



Şekil 2.42 Biyokatalizör derişimi, kosubstrat derişimi ve tekrar kullanım sayısı parametreleri

En iyi çalışma koşullarının; 2 g biyokatalizör derişimi, 27 °C reaksiyon sıcaklığı, pH=7, reaksiyon süresi 15 gün, kosubstrat derişimi % 10 etanol, 3.6 mM başlangıç substrat derişimi olduğunu belirtmişlerdir. Bu koşullar altında % ee >99 ve % dönüşüm >95 değerlerine ulaşmışlardır.

Yadav vd. (2008), yapmış oldukları çalışmada, biyokatalizör olarak havuç bitki hücrelerini kullanarak tetrahydropyranollerin enantiyoseçimli indirgenmesi gerçekleştirmişlerdir.



Şekil 2.43 Havuç bitki hücreleri ile tetrahydropyranın indirgenmesi

Biyoundirgenme deneylerini, 70 mL su içinde süspanse edilen 10 g taze havuç ve 1 mM ketonun, 1 mL etanolde çözümlenerek tepkime ortamına eklenmesi ile gerçekleştirmişlerdir.

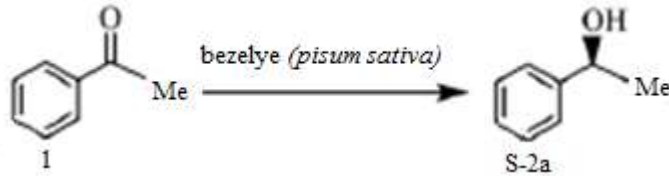
Çizelge 2.16 Havuç bitki hücreleri ile tetrahydropyranın enantiyoseçimli indirgenmesi

Substrat	Alkol	%ee	Süre, h	% verim
		94	24	92
		90	26	94
		87	30	90
		94	29	90
		90	24	92
		88	32	88
		92	38	85
		90	24	91
		92	24	92

Aril grupların bulunduğu tetrahydropyranlarda, elektron çekiminden dolayı reaksiyonun yavaşladığını ve buna bağlı olarak, elektronik etkilerin biyoindirgenme reaksiyonu kinetiğine duyarlılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Havuç bitki hücreleri biyokatalizörlüğünde tetrahydropyranın biyoindirgenmesi sonucunda % 83-94 ee aralığında (S)-alkoller elde etmişlerdir.

2.31.2 Liyofilize bitki hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalar

Yadav vd.. 2009, yapmış oldukları çalışmada, prokiral ketonları liyofilize yeşil bezelye biyokatalizörü ile enantiyoseçimli olarak indirgemişlerdir. Çalışmada, 25 g kurutulmuş bezelye 50 mL su içinde süspansiyon edilmiş ve 1 mmol prokiral keton tepkime ortamına eklenerek 25 °C'de inkübe etmişlerdir. Model substrat olarak asetofenonu incelemişlerdir (Şekil 2.44).

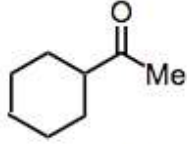
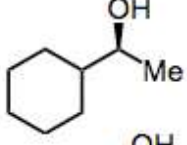
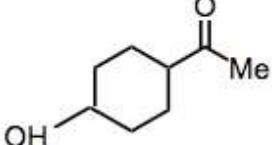
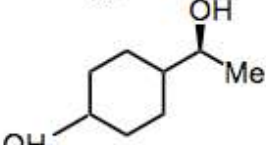
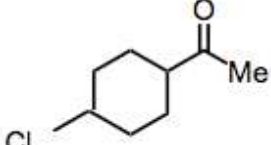
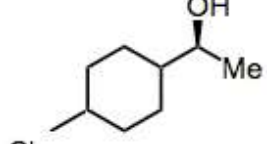
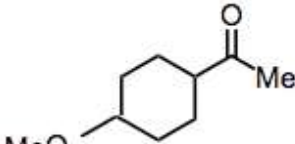
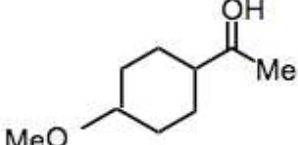
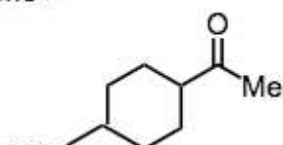
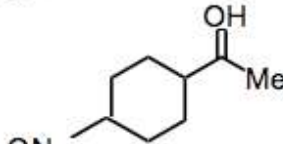
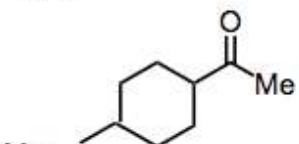
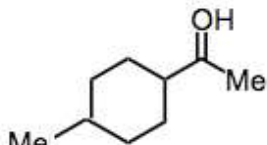


Şekil 2.44 Asetofenonun bezelye biyokatalizörlüğünde indirgenmesi

Asetofenonun indirgenme reaksiyonu üzerine halkaların bağlanma etkisini inceleyerek, arilmetil ketonların elektron etkilerinden dolayı reaksiyonu yavaşlattığını gözlemişlerdir. Arilmetil ketonların, siklik ve asiklik ketonlar ile karşılaştırıldığı zaman düşük dönüşüm ve enantiyomerik değere sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Farklı substratların, bezelye biyokatalizörü ile biyoindirgenme deneylerinde yüksek enantiyoseçimlilikle indirgendiği, her defasında (S) alkollerinin elde edildiği ve ee değerinin % 80-98 aralığında değiştiğini belirtmişlerdir.

Çizelge 2.17 Prokiral substratların, kurutulmuş bezelye biyokatalizörü ile indirgenmesi

Prokiral keton	Ürün	%verim	%ee	Konf.
		72	98	S
		60	93	S
		55	94	S
		63	91	S
		71	95	S
		65	91	S

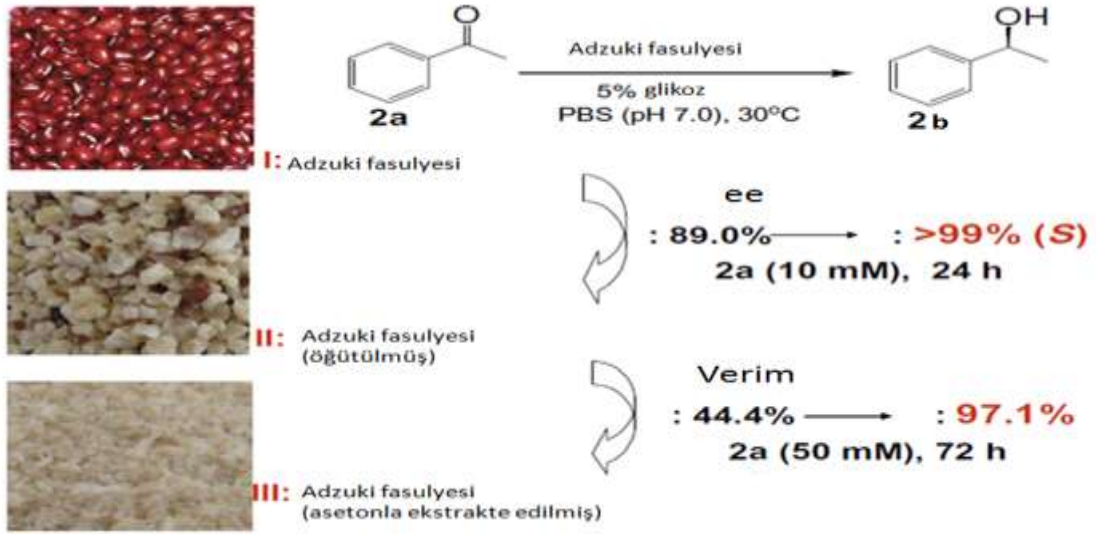
Model substrat olarak asetofenonu incelemişler ve % 78 verim ile % 98 ee elde etmişlerdir. Benzer şekilde asetofenon türevlerini de, liyofilize bezelye biyokatalizörlüğünde, kiral alkollerine % 91-98 aralığın da değişen enantiyomerik aşırılık değerleri ile indirgemişlerdir.

Xu vd. (2009), biyokatalizör olarak dondurarak kurutulmuş adzuki fasüyesini kullanarak, aromatik ketonların asimetrik indirgenmesini çalışmışlardır.



Şekil 2.45 Ketonların *adzuki fasulyesi* biyokatalizörlüğünde indirgenmesi

Yerel marketlerden alınan adzuki fasulyesini, daha küçük parçalar haline getirmek için kahve çekirdeği değirmeni kullanarak ve pH'sı 6-7 olan su içinde, düşük hızda bir çalkalama ile yaklaşık 5-6 saat oda sıcaklığında bekletmişlerdir. Süzüntüyü soğutulmuş aseton ile karıştırarak santrifüjlemiş ve çöküntüyü santrifüj sonrası liyofilize etmişlerdir. Böylece kurutulmuş enzim tozları elde etmişlerdir.



Şekil 2.46 Adzuki fasulyesinden, yeni biyokatalizörlerin hazırlanması ve performansı

Elde edilen enzim tozlarından 50 µg alarak 100 mM, pH=7 potasyum fosfat tamponunda süspansiyon etmişlerdir. Süspansiyon ortamına 50-10 ve 100 mM olacak şekilde DMSO 'da çözülmüş farklı substratlar; (2-chloro-1-phenylethanone (**1a**, 0.155 g, 1.0 mmol), phenylethanone (**2a**, 0.120 g, 1.0 mmol), 2-bromo-1-phenylethanone (**3a**, 0.199 g, 1.0 mmol), 1-(4-nitrophenyl)ethanone (**4a**, 0.165 g, 1.0 mmol), 1-(pyridin-4-

phenyl)ethanone (**5a**, 0.121 g, 1.0 mmol) ekleyerek, 30 °C'de 72 h boyunca inkübe etmişlerdir (Çizelge 2.18).

Çizelge 2.18 Adzuki fasulyesi biyokatalizörlüğünde indirgenme için, farklı derişimler için sonuçlar

Substrat	Derişim (mM)	%dönüşüm	%ee	Verim(%)
1a	10 ^a	100	>99,9 (R)	74,8
	50 ^a	100	>99,9 (R)	
	100 ^a	100	99,3 (R)	
2a	10 ^b	95,2	97,6(S)	40,8
	50 ^c	97,1	98,4(S)	
	100 ^c	90,5	98,6(S)	
3a	10 ^a	100	>99,9(R)	38,7
	50 ^a	100	99(R)	
	100 ^a	99,7	99,6(R)	
4a	10 ^d	90,4	>99,9(S)	67,8
	50 ^b	90	>99,9(S)	
	100 ^c	84	>99,9(S)	
5a	10 ^a	93,6	>99,9(S)	47,3
	50 ^d	97,6	>99,4(S)	
	100 ^d	96,9	>99,9(S)	

a: 6 h, b: 48 h, c: 72h, d: 24 h

Çalışılan derişim aralığında substrat inhibisyonunun olmadığını ve beş farklı substratın da, 100 mM, 1-(40-nitrofeniletanon) dışında, yüksek derişimler de dönüşebildiğini belirtmişlerdir. Çalışmada kullanılan substratların pratik uygulamalarda son derece kullanışlı olduğunu, örneğin, 2-kloro-1-feniletanolün (1b), fluoksetin, tomoxetine ve nisoxetine (nörotransmitter) sentezi için öncü madde olduğunu belirtmişlerdir.

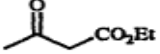
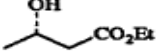
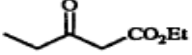
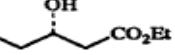
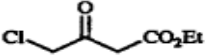
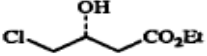
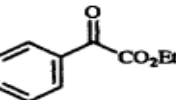
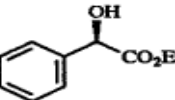
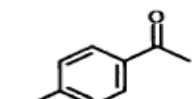
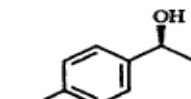
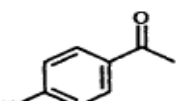
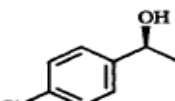
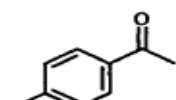
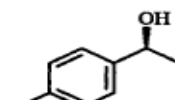
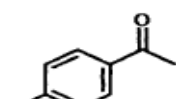
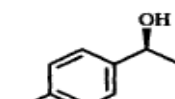
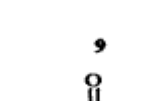
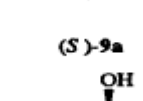
2.31.3 Tutuklanmış bitki hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalar

Naoshirna vd. (1995), yapmış oldukları çalışmada, immobilize havuç bitki hücrelerini biyokatalizör olarak kullanarak, prokiral ketonların enantiyoseçimli biyoindirgenme tepkimesini gerçekleştirmişlerdir.

Naftilasetik asit (2 ppm), kinetin (0.1 ppm) ve sukroz (% 3) içeren süspansiyon ortamındaki havuç bitki hücrelerini, MS besi yerinde kültive ederek daha sonra 150 g

havuç bitki hücrelerini % 5' lik sodyum aljinat çözeltisi ile tutuklamışlardır. Aynı süspansiyon ortamına eklenen ve çapları yaklaşık 4-5 mm olan boncukları, 182 - 215 mg keton substrat ile karıştırarak, 25 °C'de 2 gün inkübe etmişlerdir.

Çizelge 2.19 Aromatik ketonların ve keto esterlerin, immobilize havuç hücreleri ile enantiyoseçimli indirgenmesi

Substrat	Ürün	%dönüşüm	%ee	% verim
 1	 (S)-1a	100	98	38
 2	 (S)-2a	100	90	50
 3	 (R)-3a	100	52	42
 4	 (R)-4a	100	95	35
 5	 (S)-5a	100	99	63
 6	 (S)-6a	100	99	56
 7	 (S)-7a	100	98	56
 8	 (S)-8a	100	99	35
 9	 (S)-9a	57	96	30

β -keto esterleri (1-2), sırasıyla 98 ve % 90 ee ile hidroksi esterleri (S)-a ve (S)-2a halinde elde etmişlerdir. Benzer şekilde, 4-kloro-3-oksobutanoat (3) ile % 100 dönüşüme ulaştıklarını, ancak ürünün Etil (R)-4-kloro-1-hydroxybutanoate) (3a) enantiomerik saflığının % 52 ee olarak elde edildiğini belirtmişlerdir. Aromatik α -keto esterlerin (4), enantiyoseçimli biyoindirgenme tepkimelerini 24 saat içinde tamamlayarak, % 95 ee ile hidroksi ester (R)-4a elde edildiğini, aromatik keton olarak kullanılan asetofenon ve türevlerinin ise (5-9), kiral alkollerine (5a-9a), % 96-99 ee ve % 30-63 verim ile indirgendini belirtmişlerdir.

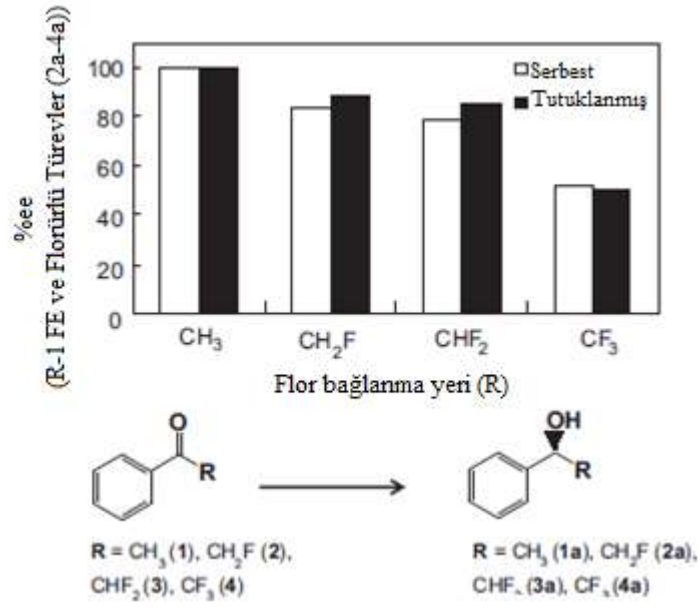
2.31.4 Mikroorganizmalarla gerçekleştirilen çalışmalar

Kato vd. (2014), yapmış oldukları çalışmada, serbest haldeki ve silika jel materyallere tutuklanmış maya hücrelerini kullanarak, asetofenon ve florlu türevlerinin asimetrik indirgenmesini incelemişlerdir (Şekil 2.45).



Şekil 2.47 Asetofenonun maya biyokatalizörlüğünde (R)-1-feniletanole indirgenmesi

Florlu ketonları esterlerinden hazırlamışlardır. Tutuklanmış maya hücrelerini 0.1 M, pH=7 fosfat tamponunda süspansiyon ederek ve 0.5 mL metanolde çözülmüş 5 mg keton ile 50 mg D-glikozu tepkime ortamına eklemişlerdir. İnkübasyon koşulları 120 rpm, 30 °C ve 2 gün olarak belirtilmiştir. 0.5 g serbest maya hücrelerini de aynı koşullarda inkübe ederek, kontrol parametresi olarak kullanmışlardır.



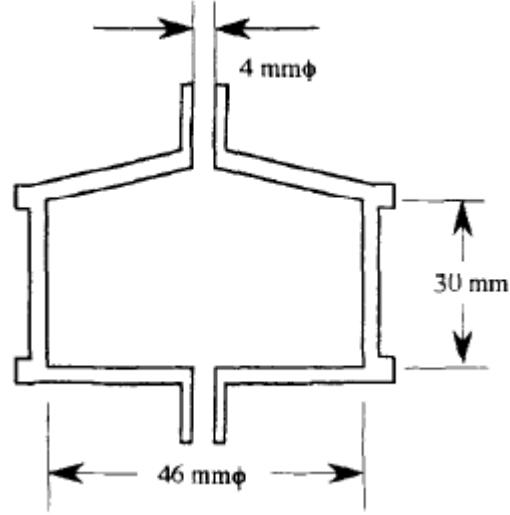
Şekil 2.48 Tutuklanmış ve serbest maya hücreleri biyokatalizörlüğünde asetofenon ve florlu türevlerinin asimetric indirgenmesi

Çalışmada asetofenonun serbest ve tutuklanmış maya hücreleri ile % 100 ee elde edildiği ve bununla beraber, ketondaki florür sayısının artışının da aksine enantiyoseçimliliği olumsuz etkilediğini gözlemişlerdir. Bu sonucu, asetofenonun florürlü türevlerinin, mayadan elde edilen ADH enzimi için doğal bir substrat olmadığı temeline dayandırmışlardır.

Adachi vd. (1997), tutuklanmış *H. Capsulata* hücreleri ile asetofenonun asimetric indirgenmesini farklı biyoreaktörler kullanarak incelemişlerdir. Çalışmada enerji kaynağı olarak glukoz kullanılarak enantiyoseçimliliğin tamamlandığını belirtmişlerdir. *H. Capsulata* hücrelerini Yeast Extract-Peptide-Dextrose (YPD) ortamında kültive ettikten sonra %1 kalsiyum aljinat ile tutuklayarak, kesikli ve sürekli sistemde üretim performansını incelemişlerdir.

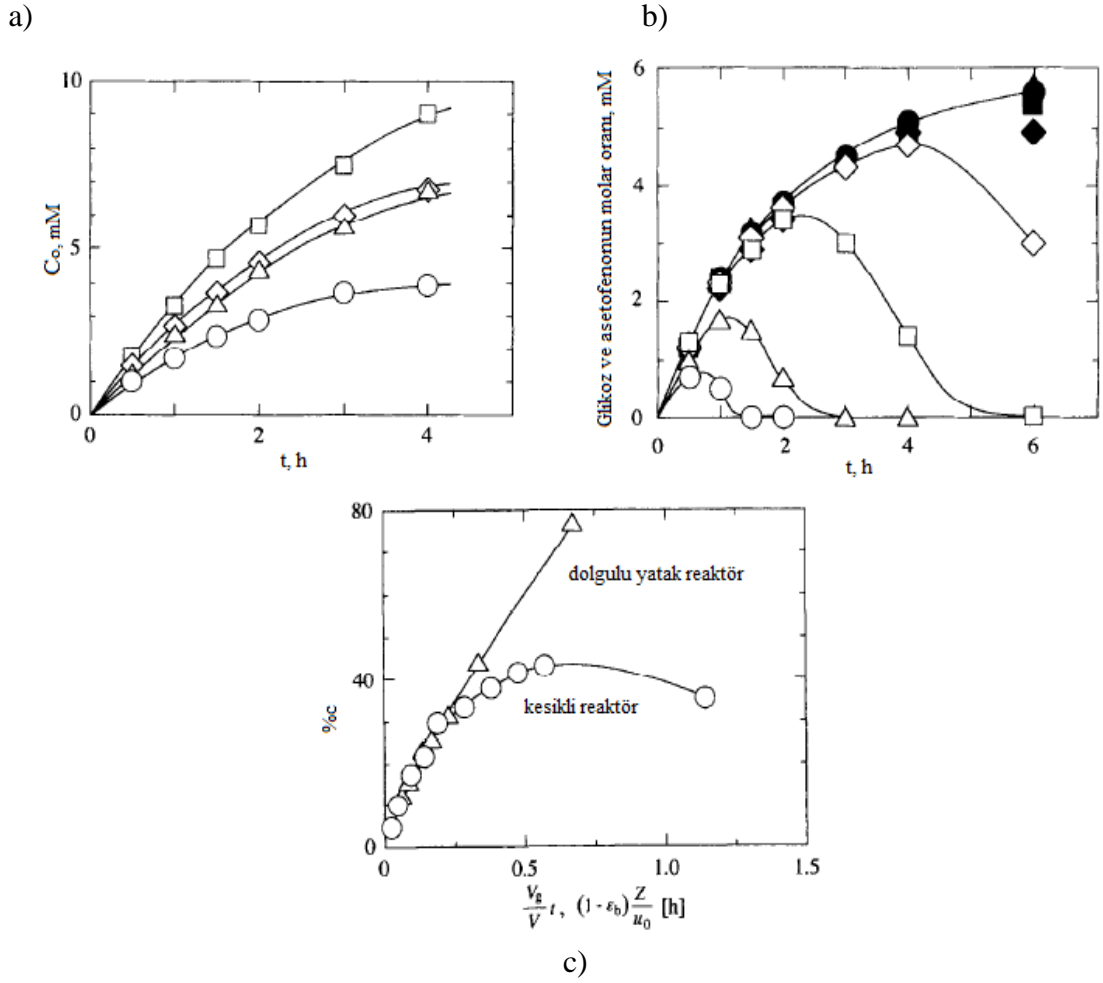
Kesikli reaktörde başlangıç substrat ve enerji kaynağı derişimi etkisini belirlemişlerdir. Dolgulu yatak biyoreaktörde ise, 20 mM asetofenon, 20 mM glukoz ve ayarlı tampon ortamını çeşitli akış hızlarında kolona göndererek, (S)-1-feniletanolün sürekli üretimini gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca tutuklanmış hücrelerin etkinlik katsayısını plug-flow dizayn eşitliğini kullanarak belirlemişlerdir.

Çalışmada, Shallow-yatak biyoreaktör kullanarak dönüşüm ve kalma süresini belirlemişlerdir (Şekil 2.47).



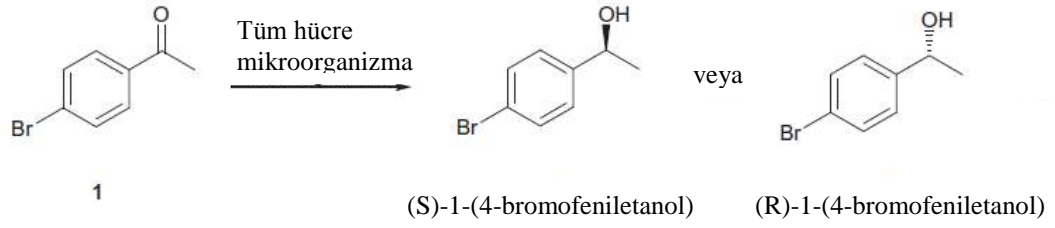
Şekil 2.49 Shallow yatak reaktörün boyutları

Çalışmada, kesikli reaktörde, enerji kaynağı olarak glikozu (1:1) oranda kullanarak, başlangıç substrat derişimini 30 mM, glukoz ve asetofenon molar oranı 2 mM, reaktör performansı sonucu dolgulu yatak biyoreaktörde % 77 dönüşüm ve shallow yatak biyoreaktörde ise % 90 dönüşüm, kalma süresi 147 dk olarak belirlemişlerdir (Şekil 2.47).



Şekil 2.50. a. 1- feniletanol üretimi üzerine substrat derişiminin etkisi. Glukoz ve asetofenon molar oranı (1:1), Semboller: o, Δ , \diamond , \square sırası ile 10, 20, 30, 40 mM başlangıç derişimi
b. Glukoz ve asetofenon molar oranı. Semboller: o, Δ , \diamond , \square , \blacksquare , \bullet , \blacktriangle ve \blacklozenge sırası ile 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 5 Glukoz/asetofenon molar oranı
c. Kesikli ve dolgu yatak performansının karşılaştırılması, V_g/V ve $(1 - \epsilon_b) Z / u_0$ sırası ile, kesikli reaktör için reaksiyon süresi ve sembolü (o), dolgu yatak reaktör için kalma süresi ve sembolü(Δ)

Ribeiro vd. (2011), yapmış oldukları çalışmada, farklı mikroorganizmalar kullanarak, 4-bromoasetofenonu, (S)-4-bromofeniletanol ve (R)-4-bromofeniletanole indirgemişlerdir.



Şekil 2.51 4-bromoasetofenonun indirgenmesi

Kullanılan mikroorganizmalar çizelge 2.20’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.20 4-bromoasetofenonun indirgenmesi

Mikroorganizma	%c	%ee	Konfigurasyon
<i>K. marxianus</i>	13.2	51	(R)
<i>Hansenula sp.</i>	6	84	(R)
<i>Pichia sp.</i>	64.5	89.8	(S)
<i>G. candidum</i>	91.9	97.4	(R)
<i>Candida sp.</i>	59.1	53.8	(R)
<i>A. niger</i>	98.9	>99	(R)
<i>M. ramannianus</i>	>99	20	(S)
<i>T. harzianum</i>	98.5	98	(R)
<i>S. cerevisiae</i> 40	6	93.2	(S)
<i>S. cerevisiae</i> 60	3.5	>99	(S)
<i>S. cerevisiae</i> 80	0	0	—
<i>P. chrysosporium</i>	13.2	31.6	(R)
<i>R. rubra</i>	96.1	98.8	(S)
<i>R. minuta</i>	99.3	98.2	(S)

Geotrichum candidum, *Aspergillus niger* ve *Trichoderma harzianum* ile yüksek ee ve dönüşümde (R)-enantiyomeri, *Rhodotorula rubra* ve *Rhodotorula minuta* ile (S)-enantiyomeri elde ettiklerini belirtmişlerdir. Seçilen dört mikroorganizma ile reaksiyon süresi etkisi incelenmiştir. Çizelge 2.21’e göre, tüm mikroorganizmalarda 10 saatte yüksek dönüşüm ve ee elde edilmiştir.

Çizelge 2.21 4-bromoasetofenonun indirgenmesi üzerine reaksiyon etkisi

Mikroorganizma	Reaksiyon süresi(h)	%c	%ee
<i>A. niger</i>	5	79.9	95.3
	10	91.1	98.2
	15	94.2	97.4
	20	83.4	95.6
<i>G. candidum</i>	5	95.7	81.2
	10	98.9	>99
	15	99.1	>99
	20	98.2	98
<i>R. minuta</i>	5	74.4	97.6
	10	96.8	98.4
	15	98.9	98
	20	98	98
<i>R. rubra</i>	5	48.9	>99
	10	94.4	>99
	15	99.2	97.4
	20	97.8	>99

Çalışmada, (S)-4-bromophenylethanol elde etmek için reaksiyon koşulları faktöriyel dizayn ile optimize edilmiştir. Mikroorganizma olarak, (S)-enantiyomeri elde edilen % 96 verim ve % 98.8 ee ile *R. Rubra* ve (R)-enantiyomeri elde edilen % 91.9 verim ve % 97.4 ee ile *Geotrichum candidum* seçilmiştir. Sonuçlar çizelge 2.22’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.22 4-bromoasetofenonun, *G. candidum* ile (R)-4-bromofeniletanole indirgenmesi

Faktörler					Cevap(20h)	
Hücre (gdw/L)	S(g/L)	pH	Glukoz(g/L)	MgCl ₂ (g/L)	%dönüşüm	%ee
4	1	4	30	0	99,4	>99
4	1	6	50	1	98,7	>99
4	3	4	50	1	40,4	30,4
4	3	6	30	0	63,2	20,6
12	1	4	30	1	99,4	>99
12	1	6	50	0	99,6	>99
12	3	4	50	0	94,5	45,6
12	3	6	30	1	80	46,2
8	1,5	5	40	0,5	89,9	76,6
8	1,5	5	40	0,5	92	49
8	1,5	5	40	0,5	89,4	82

Inkübasyon koşulları: 30 °C, 150 rpm, 20 h.

Ribeiro vd. (2011), substrat derişiminin enantiyoseçimliliğe negatif etkisi gözlenirken, diğer değişkenlerin cevap üzerine etkisiz olduğunu ve *G. Candidum* ile indirgenme reaksiyonu için optimum koşulları, 1 g/L substrat derişimi, 4.0 gdw/L hücre derişimi, 30 g/L glukoz derişimi, pH=5 olarak belirtmişlerdir ayrıca bu koşullar altında % 98 dönüşüm ve % ee > 99 elde etmişlerdir.

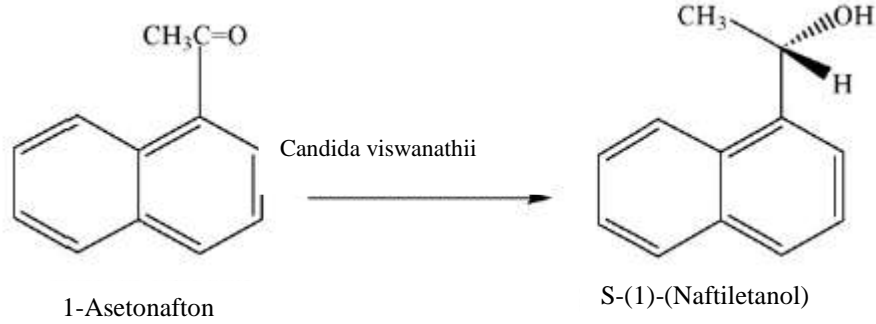
Çizelge 2.23 4-bromoasetofenonun, *R. Rubra* ile (R)-4-bromofeniletanole indirgenmesi

Faktörler					Cevap(20h)	
Hücre (gdw/L)	S(g/L)	pH	Glukoz(g/L)	MgCl ₂ (g/L)	%dönüşüm	%ee
4	1	4	30	0	47,2	>99
4	1	6	50	1	48,6	>99
4	3	4	50	1	26,4	>99
4	3	6	30	0	27,9	>99
12	1	4	30	1	97,4	>99
12	1	6	50	0	96,9	>99
12	3	4	50	0	49,5	>99
12	3	6	30	1	52,8	>99
8	1,5	5	40	0,5	55,4	>99
8	1,5	5	40	0,5	51,9	>99
8	1,5	5	40	0,5	52,2	>99

Inkübasyon koşulları: 30 °C, 150 rpm, 20 h.

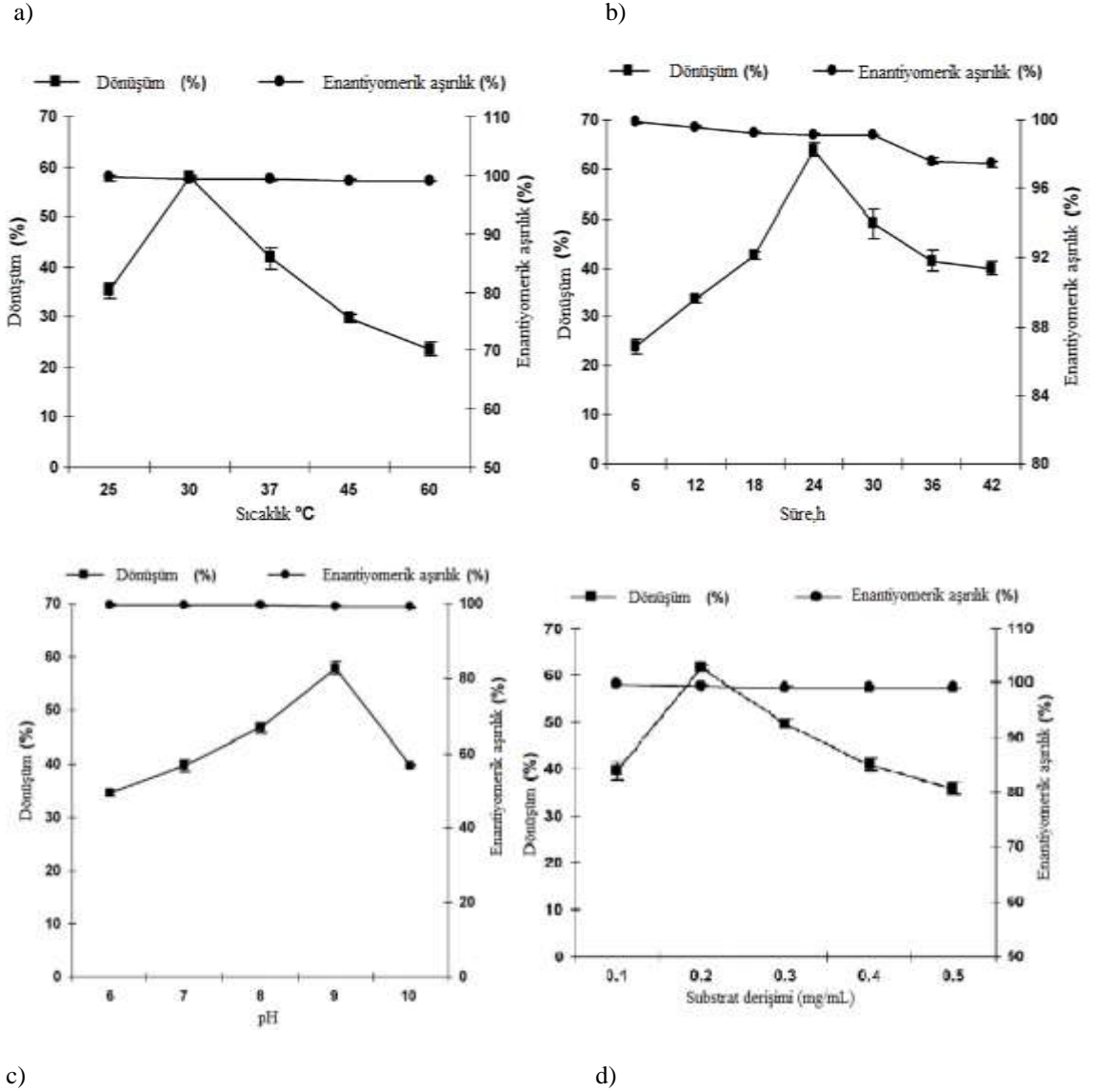
Çizelge 2.23'e göre yüksek dönüşümlere % dönüşüm > 96.9, maksimum hücre derişimi ve minimum substrat derişimi değerlerinde ulaşılmıştır. Çizelgeye göre hücre derişiminin olumlu etkisi gözlenirken, substrat derişimi ve onun hücre derişimi ile olan interaksyon etkisinin olumsuz etkilediğini, optimum koşulların, 1 g/L substrat derişimi, 12 gdw/L hücre derişimi, 30 g/L glukoz derişimi, pH=5 olarak belirtmişlerdir ayrıca bu koşullar altında % dönüşüm 97.6 ve % ee > 98.8 elde etmişlerdir.

Banerjee vd. (2007), tutuklanmış *Candida viswanathii* hücrelerini kullanarak, ketonların enantioseçimli indirgenmesini incelemiştir.



Şekil 2.52 Asetonaftonun, S-(1)-(Naftiletanole) biyokatalitik indirgenmesi

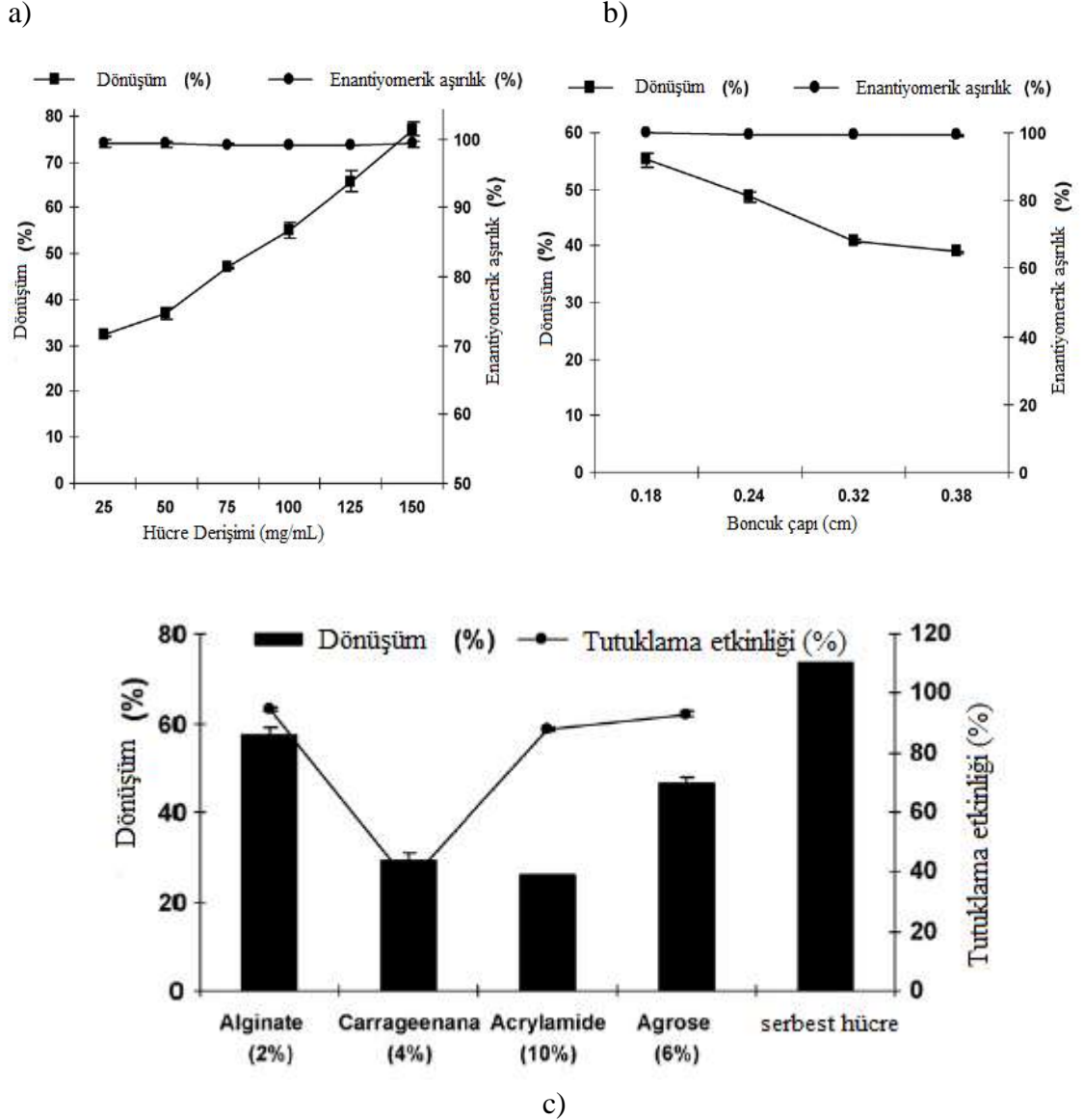
Asetonaftonun *Candida viswanathii* hücrelerini kullanarak enantioseçimli olarak indirgenmesi ile elde edilen S-(1)-Naftiletanolün, HMG Co-A redüktaz inhibitörünün sentezi için önemli bir ara ürün olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, kalsiyum aljinatın (% 1.5, w / v) en iyi immobilizasyon verimine sahip olduğu ve reaksiyon ortamı olarak denenmiş çeşitli organik çözücüler ile iyonik sıvılar arasında, izopropanolün ılımlı bir dönüşüm ile en iyi enantioseçimliliği ulaştığını belirlemişlerdir. Ayrıca, immobilize hücreler ile (50 mM, pH 9 Tris tamponu içinde 100 mg/ml), 0.2 mg/mL substrat derişimi ve 30 °C'de en iyi sonuçların elde edildiğini açıklamışlardır. Reaksiyonun 12. döngüsünden sonra, serbest hücrelere kıyasla immobilize hücrelerin biyoindirgenme verimliliğinde önemli bir azalma gözlememişlerdir. Biyoindirgenme sistemini optimize etmek için substrat derişimi, sıcaklık, pH ve reaksiyon süresi gibi etkileri incelemiştir.



Şekil 2.53. a. Dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine reaksiyon sıcaklığı etkisi [reaksiyon sıcaklığı aralığı; 25 – 60 °C, 200 rpm ve 24 h.]
 b. Dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine reaksiyon süresi etkisi [tutuklanmış *C. viswanathii* hücre derişimi; 100 mg/mL, 30 °C ve 200 rpm]
 c. Dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine pH etkisi [pH aralığı; 6-10, tutuklanmış *C. viswanathii* hücre derişimi; 100 mg/mL, 30 °C, 200 rpm]
 d. Dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine substrat derişimi etkisi [substrat derişimi aralığı; 0,1-0,5 mg/mL, 30 °C, 200 rpm, 24h]

Biyoundirgenme deneyleri sonucunda; reaksiyon süresi 24 h (% 64 dönüşüm ve % ee > 99), reaksiyon pH'sı 9 (% 57 dönüşüm ve % ee > 99), reaksiyon sıcaklığı 30 °C (% 60 ve % ee > 99) ve substrat derişimi 0.2 mg/mL (%64 dönüşüm ve % ee > 99) olarak elde edildiğini belirtmişlerdir.

Aynı çalışmada, tutuklanmış hücre derişimi etkisi, farklı tutuklama matrisi etkisi ve boncuk çapı etkisini incelemişlerdir.



Şekil 2.54. a. Dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine hücre derişimi etkisi. [hücre derişimi aralığı; 25 – 150 mg/mL, 200 rpm ve 24 h.]
b. Dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine boncuk çapı etkisi. [0.18, 0.24, 0.32 ve 0.38 cm, 30 °C ve 200 rpm]
c. Dönüşüm üzerine farklı tutuklama matrisi etkisi

Tutuklanmış *Candida viswanathii* hücreleri ile yapılan dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine hücre derişimi etkisi deneylerinde, 100 mg/mL derişim üzerinde hücrede sızdırma gerçekleştiğini, boncuk çapının 0.18 cm üzerinde olduğu durumda, substratın kütle aktarımında sınırlamaların daha az olması nedeniyle yüksek dönüşüm (%56

dönüşüm ve % > 99 ee) elde edildiğini ve tutuklama matrisi olarak % 2 (w/v) aljinatın tutuklama veriminin daha yüksek (% 80) olduğunu belirtmişlerdir.

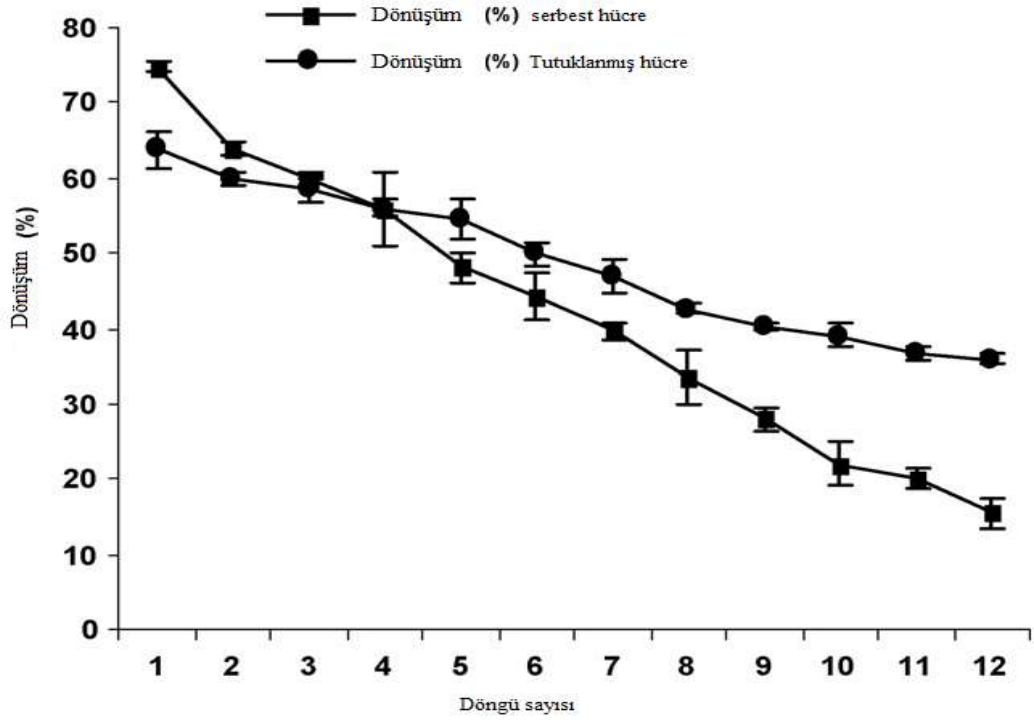
Aynı çalışmada organik çözücü olarak, benzen (Log P 2.02), dioksan (Log P 0.39), hegzan (Log P 3.9), IPA (Log P 2.14), THF (Log P 0.526), piridin (Log P 0.77), DMF (Log P -0.87), DMSO (Log P -2.03) ve etanol (Log P -0.8) kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.24 Organik çözücü varlığında biyotransformasyon (%10 (v/v))

Organik çözücü	%dönüşüm	%ee
Benzene	28	–
Dioxane	30	–
Hexane	50	62
IPA	39	90
THF	6	–
Pyridine	5	–
DMF	18	–
DMSO	16	–
Ethanol	28	65

Banerjee vd. (2007), çözücülerin, hem dönüşüm hem de enantiyomerik aşırılık değerini ciddi şekilde etkilediğini belirterek, Çözücülerin hidrofobikliklerini tanımlayan Log P yani 1-oktanol ve su içerisindeki dağılma katsayılarının enzim aktivitesi üzerine etkisi olduğu belirtilmektedir. Log P değerinin, çözelti polaritesinin niceliksel göstergesi olarak kullanıldığını ve Log P değeri >2 olan organik çözücülerde düşük dönüşüm ve ee elde edilirken, 2 > Log P >4 olan organik çözücülerde ise nispeten daha iyi sonuçlar elde edildiğini vurgulamışlardır. Bu durumun ayrıca, organik çözücülerinin ilk eylemlerinin, hücre membranı olduğunun göstergesi olabileceğini savunmuşlardır.

Aynı çalışmada serbest ve tutuklanmış hücrelerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir (Şekil 2.53).



Şekil 2.55 Serbest ve tutuklanmış hücrelerle tekrar kullanılabilirlik

Çalışmada, serbest hücrelerin de tutuklanmış hücreler gibi biyoindirgenme için tekrar tekrar kullanıldığını ve başlangıçta, beklendiği gibi serbest hücrelerin daha yüksek dönüşüm gösterdiğini fakat 3. döngüden itibaren tutuklanmış hücrelerin gösterdiği dönüşüm miktarının daha yüksek olduğunu ayrıca, 9. döngüden sonra tutuklanmış hücrelere göre, serbest hücrelerin verdiği dönüşümün ihmal edilebileceğini ifade etmişlerdir.

Literatür değerlendirmesi sonuçlarına göre, enantiyoseçimli biyoindirgenme tepkimesi üzerine yapılan çalışmalarda, farklı model substrat ve farklı biyokatalizör etkisi ile reaksiyon sıcaklığı etkisi üzerinde durulmaktadır. Fakat substrat derişimi, biyokatalizör derişimi, tutuklama işlemi, reaktör tipi etkisi ve kinetik çalışmalara yer verilmediği, üretim verimini arttırmak ve işletme parametrelerini optimize etmek için çalışma olmadığı görülmektedir. Sürekli sistemde, daha kısa tepkime sürelerinde, istenilen dönüşüme ulaşılabilir. Ayrıca, tutuklanmış bitki hücrelerinin kullanıldığı ve sürekli işletilen sistemde asetofenonun indirgenmesi, elde edilecek veriler ışığında kinetik çalışmalar ve verilerin optimizasyonu bu çalışma kapsamında ilk kez gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu araştırmada substrat olarak kullanılan asetofenon ve elde edilen ürün feniletanolün saf enantiyomerleri olan (R)-1-feniletanol ve (S)-1-feniletanol Aldrich'ten temin edilmiştir. Fiziksel özellikleri EK 1'de verilmiştir. Feniletanol üretiminde biyokatalizör olarak kullanılan sebze ve meyveler yerel marketlerden temin edilmiştir.

Çözücü olarak kullanılan metil tersiyer bütül eter, dimetil sülfoksit ayrıca HPLC analizinde kullanılan yüksek saflıktaki hegzan ve 2-propanol de Merck'ten temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Kalibrasyon grafiği

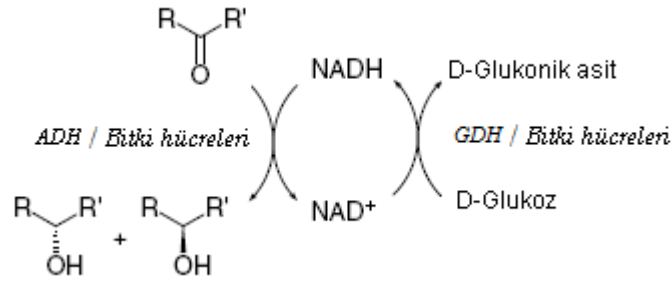
Substrat olarak seçilen asetofenon ve (R)-1-feniletanol ve (S)-1-feniletanol için uygun derişim aralığını belirlemek amacıyla kalibrasyon grafiği çizilmiştir (EK 2).

3.2.2 Enzim aktivitesi

Aktivite tayinlerinde genellikle ya kaybolan substrat miktarı veya meydana gelen ürün miktarı tayin edilerek enzimlerin aktiviteleri ölçülür. Enzim aktivite tayininde yöntem seçerken pratik oluşuna ve kısa sürede yapılmasına, ayrıca hassas oluşuna da özen göstermek gerekir.

Karbonil grubunu indirgeyebilmek için ADH enzim kaynağı olarak çeşitli meyve ve sebzeler kullanılmıştır. Alkol dehidrojenazlar kofaktöre ihtiyaç duyar ve kofaktörler oldukça pahalı maddelerdir. Tepkime ilerledikçe ortamdaki kofaktör tükeneceğinden ve kofaktörler pahalı olduklarından, saf enzimler yerine bitkileri, alkol dehidrojenaz

kaynağı olarak kullanmak daha ekonomiktir. Bitki hücresinde bulunan GDH enzimi ve glikoz molekülü kofaktör rejenerasyonunu sağlayabilir.



Şekil 3.1 Asetofenonun bitki hücreleri biyokatalizörlüğünde indirgenmesi

Farklı bitkilerin (havuç, liyofilize havuç, patates, üzüm, turp) hücre içi enzim olan ve şekildeki tepkimeyi katalizleyen ADH aktiviteleri etil alkolün yükseltgenme tepkimesiyle oluşan β -NADH'ın UV spektrofotometresinde 340 nm dalga boyunda absorbansta neden olduğu artış ölçülerek analizlenmiştir (Çizelge 3.1).



Çizelge 3.1 ADH deneyi analizleri sırasında kullanılan örnek ve kör çözeltileri

<i>Örnek</i>	<i>Kör</i>
50 μ L etanol çözeltisi	50 μ L etanol çözeltisi
(son derişimi)	(son derişimi)
1 mL distile su	1 mL distile su
1.25 mL β -NAD çözeltisi	1.25 mL β -NAD çözeltisi
(son derişimi)	(son derişimi)
200 μ L Havuç	200 μ L distile su
<i>Toplam hacim:2.5 mL</i>	<i>Toplam hacim:2.5 mL</i>

Çizelge 3.1’de gösterilen yöntem sonucunda yapılan analizler sonucunda Eşitlik 3.2 ile ADH enzimi için aktivite değerleri hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite U/L} = \Delta\text{Abs/dak} \times (V_T \times 1000) / (\epsilon \times V_o \times b) \quad (3.2)$$

3.3 Biyoindirgenme Deneyleri

Biyoindirgenme deneyleri kesikli ve sürekli sistemde gerçekleştirilmiştir. Deneyler, kesikli biyoreaktörlerde, biyokatalizör olarak taze havuç, liyofilize havuç, tutuklanmış taze havuç ve tutuklanmış liyofilize havuç, sürekli biyoreaktörde ise tutuklanmış taze havuç hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kesikli ortamda yapılan üretimde, biyokatalizör olarak *taze havuç*, *liyofilize havuç*, *tutuklanmış taze havuç* ve *tutuklanmış liyofilize havuç* kullanılarak biyotransformasyon verimi üzerine incelenen parametrelerin bazıları aşağıda sıralanmıştır;

1. Başlangıç substrat derişimi
2. Biyotepkime süresi
3. Hücre derişimi
4. Ortam pH’ı
5. Sıcaklık
6. Biyokatalizörün (taze havuç) tekrar kullanılabilirliği
7. Kofaktör rejenerasyonu
8. Aljinat derişimi
9. Tutuklanmış (taze havuç) biyokatalizör çapı
10. Tutuklanmış hücrelerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

3.3.1 Kesikli sistemde serbest biyokatalizör ile biyoindirgenme

Kesikli ortamda parametre etkileri incelenirken, substrat olarak asetofenon, biyokatalizör olarak *taze havuç* ve *liyofilize havuç*, tampon ortamı olarak sodyum fosfat ve organik çözücü kullanılmıştır. Tepkimeler, 80 mL’lik biyoreaktörlerde, 50 mL

çalışma hacminde sabit sıcaklık ve karıştırma hızı kontrollü orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir.

3.3.2 Taze ve liyofilize havucun hazırlanması

Taze havuç marketten satın alınıp, çürük ve yapısı bozuk olanlar ayıklanmış ve suyla yıkanarak temizlenmiştir. Temizleme işleminden sonra havuçlar delik çapı < 1 mm olan rende ile küçültülmüştür.

Liyofilize havuç elde etmek için kurutma işlemi öncesi, içindeki suyu buz olarak bağlayabilmek için derin dondurucuya (-40 °C) konmuş ve dondurulmuştur. Belli bir miktar taze havuç 0.024 mbar ve -50 °C'de 24 h dondurularak kurutulmuş ve sonuç olarak liyofilize havuç elde edilmiştir.

3.3.3 Kofaktör rejenerasyonu

Dört farklı kosubstrat (glikoz, früktoz, sorbose, mannitol) eşliğinde kofaktör rejenerasyonu için deneyler yapılarak, bitki biyokatalizörü liyofilize havuç için kofaktör ihtiyacı incelenmiştir. Çalışmada, her bir kofaktör öncelikle 110 mM olarak tepkime ortamına ilave edilmiştir. Sonra glikoz ile kofaktör rejenerasyonu için, tepkime ortamına farklı miktarlarda glikoz (55 - 222 mM) ilave edilmiştir.

3.3.4 Kesikli sistemde tutuklanmış hücreler ile biyoindirgenme

Kesikli ortamda parametre etkileri incelenirken, substrat olarak asetofenon, biyokatalizör olarak Ca-aljinata tutuklanmış *taze havuç* ve *liyofilize havuç*, tampon ortamı olarak sodyum fosfat, tutuklu havuç hücrelerinin yapısının dağılmaması için CaCl_2 ve çözücü olarak MTBE (metil tersiyer bütül eter) kullanılmıştır.

3.3.4.1 Tutuklama yöntemi

Ca-aljinatta tutuklama yöntemi basitliği ve biyokatalizöre zarar vermemesi sebebiyle bakteri, maya, küf hücrelerinin, enzim komplekslerinin ve bitki hücrelerinin immobilizasyonunda başarı ile kullanıldığından dolayı tercih edilmiştir. Dayanak maddesi içerisine hapsedme ile tutuklama yönteminde, enzim veya hücreler dayanak maddesine direkt olarak bağlanma yerine polimer matriksi içerisine hapsedilirler. Bu yöntemde biyokatalizör bir membranın arkasında veya bir jel yapının içerisinde tutuklanır. Tutuklama, biyokatalizörün bir monomer çözeltisine karıştırılıp, kimyasal bir reaksiyon veya sıcaklık değişikliği ile polimerizasyonu, bir membranın arkasına hapsedilmesi ile veya önceden oluşturulan bir polimerin jelleşmesi ile gerçekleştirilir. Polimer içerisinde hapsedme ile immobilizasyon diğer yöntemlere göre daha ılımlı koşulların kullanıldığı ve hücelere en az zarar veren yöntem olduğu için hücrelerin immobilizasyonunda en çok kullanılan yöntemdir. Tutuklama için en çok kullanılan polimerler olan kalsiyum aljinat, kapa karagenan, poliakrilamid, agar dışında agaroz, jelatin, selüloz türevleri, kollagen gibi maddelerle de çalışmalar yapılmıştır (Cheetham 1983, Rosevear 1984, Rosevear vd.1987).

3.3.4.2 Kalsiyum aljinat derişimi

Kalsiyum aljinat jelinin dayanıklılığını etkileyen başlıca faktörler aljinatın tipi, polimer konsantrasyonu ve CaCl_2 çözeltisinin konsantrasyonudur. Jelin parçalanıp çözülmesi substrat çözeltisine Ca^{2+} ilavesi ile engellenebilir (Cheetham vd.. 1979). Tutuklu hücrenin yapısının dağılmaması için, tampon ortamına, 0.05 M CaCl_2 eklenmiştir. Aljinat derişimi 1, 1.5, 2 (w/v) olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.3.4.3 Pelletlerin oluşturulması

Hücreler, Ca-alginat jeline tutuklandığında; % 2 (w/v)'lik alginat çözeltisi, saf suda çözülerek hazırlanmış ve steril edilmiştir (121 °C 10 dk) sonra içerisine istenilen oranda örneğin; taze havuç için (10 g), 100 mL alginat çözeltisine eklenerek homojenlik sağlanıncaya kadar karıştırılmıştır. Hücre ve alginat karışımı devamlı

kariştırılarak 0.3 M CaCl₂ çözeltilisine oda sıcaklığında 2 mL'lik şiringa kullanılarak damlatılmıştır. Tüm bu işlemler steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Tutuklanmış hücre içeren alginat jeli taneciklerinin tam olarak olgunlaşması için 2 saat 0.2 M CaCl₂ çözeltilisinde bekletilmiştir. Pelletler daha sonra kullanılmak üzere süzülerek 0.27 M CaCl₂ çözeltilisine alınmış ve +4 °C'de saklanmıştır. 2, 2.4 mm çapında tutuklanmış hücreleri içeren boncuklar elde edilmiştir. Boncukların çapını belirlemek için gelişigüzel 20 boncuk seçilmiş ve çapları mikrometre (NSK micrometer) kullanılarak ölçölmüştür.



Şekil 3.2 Tutuklama yöntemi deney sistemi

3.3.5 Kesikli sistemde etkin difüzyon katsayısının belirlenmesi

Tutuklanmış enzimler, serbest çözünen enzimlerde olmayan yeni bir probleme neden olabilir. Bu problemler, büyük partiköl büyüklüğündeki enzimlerden kaynaklanan kütle aktarım direneridir. Tutuklanmış enzim, partiköl yüzeyine tutuklanmış ve sadece sıvı yığınından reaksiyonun gerçekleştiği partiköl yüzeyine kütle aktarımı söz konusu ise dış

kütle aktarımı, kopolimerizasyon veya mikroenkapsülasyon ile tutuklanıyorsa, partikül içi kütle aktarım dirençleri gerçekleşir.

Partikül içi kütle aktarım direncinin ve partikül dışı film kütle aktarım katsayının değişen hidrodinamik şartlar ve konsantrasyon değerlerine göre tepkimeyi nasıl etkilediklerinin incelenmesi ve hakim direncin hangisi olduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Dış yayılım kütle aktarım dirençlerinin tepkime üzerine etkisi anlamak için, 100, 150 ve 170 rpm karıştırma hızında, aljinata tutuklanmış *taze havuç* ile kesikli sistemde deneyler yapılarak başlangıç tepkime hızları hesaplanmıştır.

İç yayılım kütle aktarım dirençlerinin tepkime üzerine etkisi anlamak için ise *taze havuç* ve farklı çaplarda *tutuklanmış taze havuç* ile kesikli biyoreaktörde deneyler yapılarak, tepkime hızları belirlenmiştir.

Deneyler, 1, 1.5, 2 ve 4 mM başlangıç substrat derişiminde gerçekleştirilmiştir. Biyoindirgenme tepkimeleri, 0.01 M CaCl₂ içeren pH 7.6 tris tamponunda, 50 mL çalışma hacminde, 33 °C ve 170 rpm karıştırma hızında, sıcaklık kontrollü orbital çalkayıcılarda gerçekleştirilmiştir.

Michaelis-Menten kinetik sabitleri için, Lineweaver-Burk grafiği doğrusallaştırması yapılmıştır. $1/r_o - 1/C_{S_o}$ değişimi grafiğe geçirilerek, serbest hücre için gerçek kinetik sabitler ve tutuklanmış hücre için gözlenen kinetik sabitler $K_{M,göz}$ ve $I_{maks,göz}$, sırasıyla eğim ve kaymadan hesaplanmıştır.

Kütle aktarım hızının toplam reaksiyon prosesi üzerine etkisini ortaya koymak amacıyla etkinlik katsayısı, $\eta = (\text{görünür reaksiyon hızı}) / (\text{kütle aktarım direnci olmadığı durumdaki reaksiyon hızı})$ olarak tanımlanmaktadır. Örneğin; etkinlik katsayısının birden küçük olduğu durumda, kütle aktarım dirençlerinin, katalizörün görünür aktivitesini azalttığı yönde davrandığı ileri sürülebilir.

3.3.6 Cevap yüzey yöntemi ile biyoindirgemenin optimizasyonu

Cevap yüzey yöntemi (CYY) (Response surface methodology), proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntem ile parametrelerin prosese olan etkileri incelenmekte ve bu parametrelerin optimum seviyeleri belirlenmektedir. CYY hem endüstriyel hem de laboratuvar ölçekli çalışmalarda bilim araştırmacıları tarafından son zamanlarda oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem matematiksel ve istatistiksel verileri bir arada değerlendiren bir algoritmaya sahiptir. Endüstriyel alanda birçok kullanım alanı olmakla beraber, literatür çalışmalarında optimum deney şartlarını belirlemede son zamanlarda sıkça kullanılmaktadır (Myers ve Montgomery, 1995; Şahan vd.. 2010).

Yöntemin uygulanması, yapılan deneylerde kullanılan bağımsız değişkenlerden elde edilen cevaplara dayanmaktadır. Bu yöntem, uygun deneysel tasarımdan elde edilen nicel veriler ile çok faktörlü modellerin oluşturulması ve benzer şekilde çözümlenmesinde kullanılır. Cevap yüzeyi olarak grafik şeklinde sunulabilen bu modeller; farklı faktörlerin cevabı nasıl etkilediğinin belirlenmesinde, değişkenler arasındaki ilişkiyi açıklamakta ve cevap yüzeyinin tüm faktörlerinin birleşik etkisini ortaya çıkarmakta kullanılır.

Bağımsız değişkenler; substrat derişimi, liyofilize havuç için biyokatalizör derişimi, karıştırma hızı ve tepkime süresi, cevap değişkeni ise ürün olarak elde edilen (S)-1-feniletanol derişimi olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.2 Merkez Tümlleşik Tasarım (CCD) için kullanılan bağımsız değişkenler

Bağımsız değişkenler	Birimler	-1 Seviye	+1 Seviye
Hücre derişimi, (C_{bl})	g/L	10	50
Karıştırma hızı, (N)	rpm	100	200
Reaksiyon süresi, (t)	h	12	96
Substrat derişimi, (C_{s0})	mM	0.1	2

Yanıt ve bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan ilişkilerine göre farklı faktör seviyelerinin kombinasyonlarının oluşturulmasında Design-Expert® 8.0.7.1 programı kullanılmıştır.

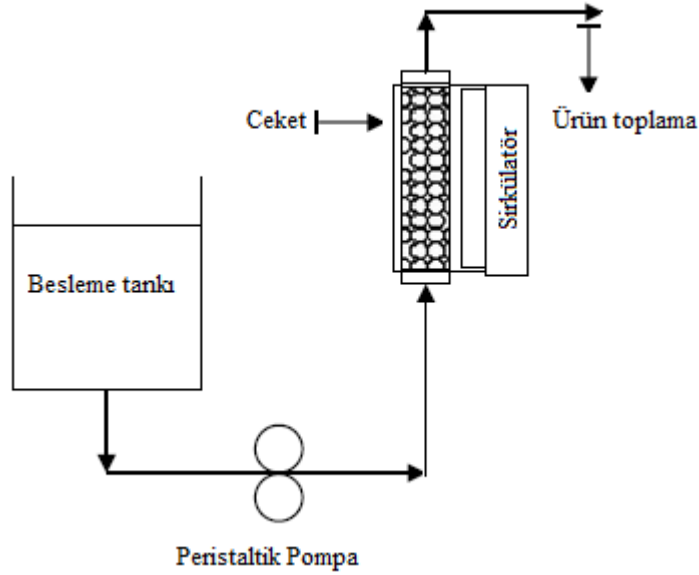
Liyofilize havuç ile asetofenonun biyoundirgenmesinde en uygun koşulları belirlemek için yapılan deneyler, 80 mL'lik biyoreaktörlerde, 50 mL çalışma hacminde, pH=7 fosfat tamponunda, 33 °C sabit sıcaklık ve 150 rpm karıştırma hızı kontrollü orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3 Merkez Tümlleşik Tasarım (CCD) için deneysel matris

Deney	A:C_{bl}	B:karıştırma	C:t	D:C_{S0}
	g/L	rpm	h	mM
1	10.00	100.00	96.00	2.00
2	30.00	150.00	100.20	1.05
3	30.00	205.00	54.00	1.05
4	10.00	200.00	96.00	2.00
5	30.00	150.00	54.00	1.05
6	30.00	150.00	54.00	1.05
7	10.00	100.00	96.00	0.10
8	50.00	100.00	96.00	2.00
9	50.00	200.00	12.00	0.10
10	50.00	100.00	12.00	2.00
11	10.00	200.00	96.00	0.10
12	30.00	150.00	54.00	1.05
13	10.00	200.00	12.00	2.00
14	50.00	100.00	96.00	0.10
15	52.00	150.00	54.00	1.05
16	50.00	200.00	12.00	2.00
17	10.00	200.00	12.00	0.10
18	50.00	100.00	12.00	0.10
19	30.00	150.00	54.00	1.05
20	8.00	150.00	54.00	1.05
21	50.00	200.00	96.00	2.00
22	10.00	100.00	12.00	0.10
23	30.00	150.00	54.00	2.09
24	50.00	200.00	96.00	0.10
25	30.00	150.00	7.80	1.05
26	30.00	150.00	54.00	0.01
27	30.00	150.00	54.00	1.05
28	10.00	100.00	12.00	2.00
29	30.00	150.00	54.00	1.05
30	30.00	95.00	54.00	1.05

3.3.7 Sürekli sistemde dolgulu kolon biyoreaktörde tutuklanmış hücreler ile biyoindirgenme

Sürekli sistemde gerçekleştirilen biyoindirgenme deneyleri, çevresinde ısı aktarım ceketi bulunan dolgulu kolon biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Deney düzeneği şekil 3.3’de verilmiştir. Kolon 1.7 cm iç çapında ve 27 cm dolgu yüksekliğindeki pyrex camdan yapılmıştır. Sisteme besleme girişi, peristaltik pompa ile kolonun altından yapılmaktadır. Isı aktarımı, sabit sıcaklıktaki su banyosu yardımı ile ceketten sağlanmaktadır. Örnekler ise dolgulu yatağın hemen üzerinden alınmaktadır.



Şekil 3.3 Sürekli sistem deney düzeneği

Dolgulu kolon biyoreaktörde, tutuklanmış taze havuç hücrelerindeki enzimin (ADH) maksimum enantiyoseçimlilik ve enantiyomerik aşırılık değeri verdiği koşulları tespit amacıyla, akış hızı, kolonda kalma süresi, substrat derişimi gibi değişik parametreler incelenmiştir. Çalışmaya başlamadan önce tutuklanmış taze havuç hücreleri kolona doldurulmuş ve çalışma öncesi kolonun gözenekliliğine bakılmıştır. Kolon gözenekliliği tespit edildikten sonra farklı akış hızları ile organik çözücüde çözülmüş substrat, 0.05 M CaCl_2 ve pH 7.6 Tris tamponu içeren besleme çözeltisi kolona gönderilerek, saat başı alınan örnekler HPLC analizi için hazırlanmıştır.

3.3.8 Kolon gözenekliliği ve kalma süresinin belirlenmesi

Dolgulu kolon biyoreaktörde çalışmaya başlamadan önce kolon gözenekliliğine bakılmıştır. Bu amaçla kolon içindeki boş hacim 61 mL olarak ölçülmüştür. Hacmi belli olan kolon içine, katı (tutuklanmış taze havuç) doldurulduktan sonra, içine hızlı bir şekilde su boşaltılmıştır. Tutuklanmış havuçların üzerine biriken su hacmi yani tepkime hacmi 20 mL olarak ölçülmüştür. Katı hacmi ise bu durumda 41 mL olacaktır.

$$\varepsilon = \frac{V_o - V_k}{V_o} = \frac{61 - 41}{61} = 0.33 \quad (3.3)$$

Kolon gözenekliliği tespit edildikten sonra Eşitlik 3.4 ile tepkime hacmi (V) bulunmuş ve bu değer yardımıyla kalma süresi hesaplanmıştır (Eşitlik 3.5).

$$V = V_o \varepsilon = 61 \times 0.33 = 20 \text{ mL} \quad (3.4)$$

$$\tau = V/Q \quad (3.5)$$

3.3.9 HPLC analizleri

Tepkime ürünleri ve substrat analizleri için hazırlanan örnekler, Spectra SYSTEM HPLC şekil 3.4 cihazında, Chiralcell OB kolonu (4.6 mm x 50 mm, Daicel Chemical Ind. Ltd. France) UV dedektör ile kiral kolonda, çizelgede gösterilen analiz koşulları ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4 HPLC sistemi

Çizelge 3.4 HPLC analiz koşulları

Çözücü	Akış Hızı	Enjeksiyon Hacmi	Kolon Sıcaklığı	UV Dedektör Dalga Boyu
n-hegzan/2-propanol: 95 / 5	0,8 ml/dk	10 µL	30 °C	254 nm

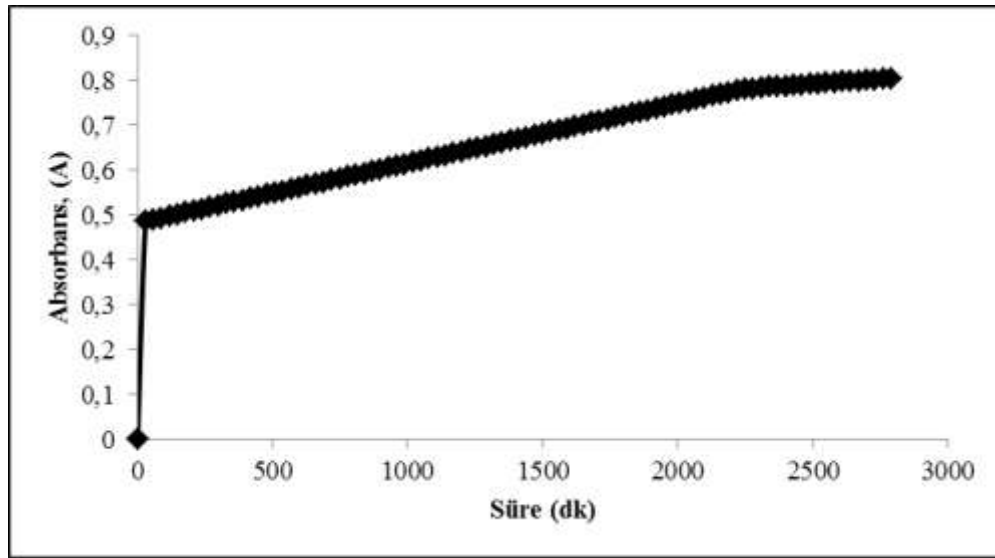
Çizelge 3.4’de gösterilen koşullara göre gerçekleştirilen analiz sonuçlarına bağlı olarak enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm değerleri hesaplanmıştır. HPLC analizleri sonucu tüm deneylerde (S)-enantiyomerinin oluştuğu saptanmıştır. Analizlerde Chiralcel OB kolonunda çalışılan koşullarda asetofenonun kolonda kalma süresi 13-15 dk, (S)-1-feniletanol 8-10 dk ve (R)-1-feniletanol 11-13 dk dır. Örnek bir kromatogram EK 3’de verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

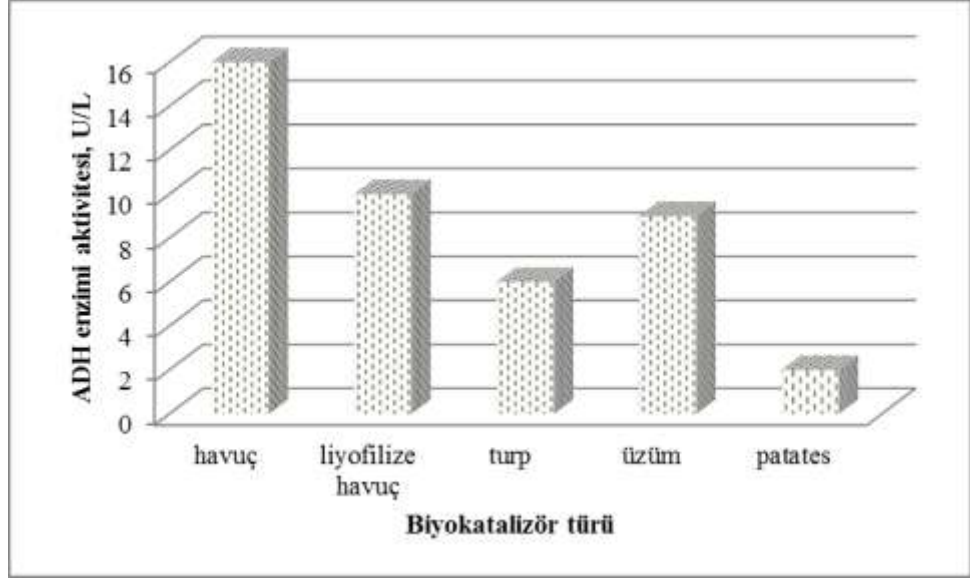
Bu çalışmada, ilaç sanayi için önemli girdiler olan enantiyomerik saflıkta (S)-1-feniletanol üretimi için öncelikle uygun biyokatalizör seçimi gerçekleştirildikten sonra asetofenondan (S)-1-feniletanol üretimi tepkimesi, kesikli ve sürekli sistemde gerçekleştirilmiştir.

4.1 Enzim Aktivitesi Tayini

Karbonil grubunu indirgeyebilmek amacıyla ADH enzim kaynağı olarak kullanılan çeşitli meyve ve sebzelerin (taze havuç, liyofilize havuç, patates, turp, üzüm) aktiviteleri incelenmiştir. Bunun için Bölüm 3.2’de anlatılan spektrofotometrik yöntem kullanılarak taze bitkilerden havuç (*D.carota*) için absorbansın zaman ile değişimi izlenmiş ve şekil 4.1 elde edilmiştir. Grafiklerin başlangıç absorbans artış hızlarından yararlanarak Bölüm 3.2’de verilen eşitlik ile hesaplanan ADH aktiviteleri şekil 4.2’de verilmiştir. Örnek bir hesaplama ve diğer bitkiler için absorbansın zamanla değişimi EK 4’te verilmiştir.



Şekil 4.1 *D.carota*(Havuç) biyokatalizörü için zamana karşı absorbans değişimi (V=2,5 mL, C_{etanol}=20 mM, β-NAD=20 mM, *D.carota*= 200 µl, T=33°C, pH=7 fosfat tamponu, λ=340 nm)



Şekil 4.2 Farklı biyokatalizörlerin ADH aktivitesi

Şekil 4.2'den de görüldüğü gibi *D. Carota*, liyofilize *D. Carota*, *Solanum tuberosum*, *Raphanus sativus*, *Vitaceae* biyokatalizörlerinin ADH enzimi aktiviteleri sırası ile 16, 10, 6, 9 ve 2 U/L olarak bulunmuştur.

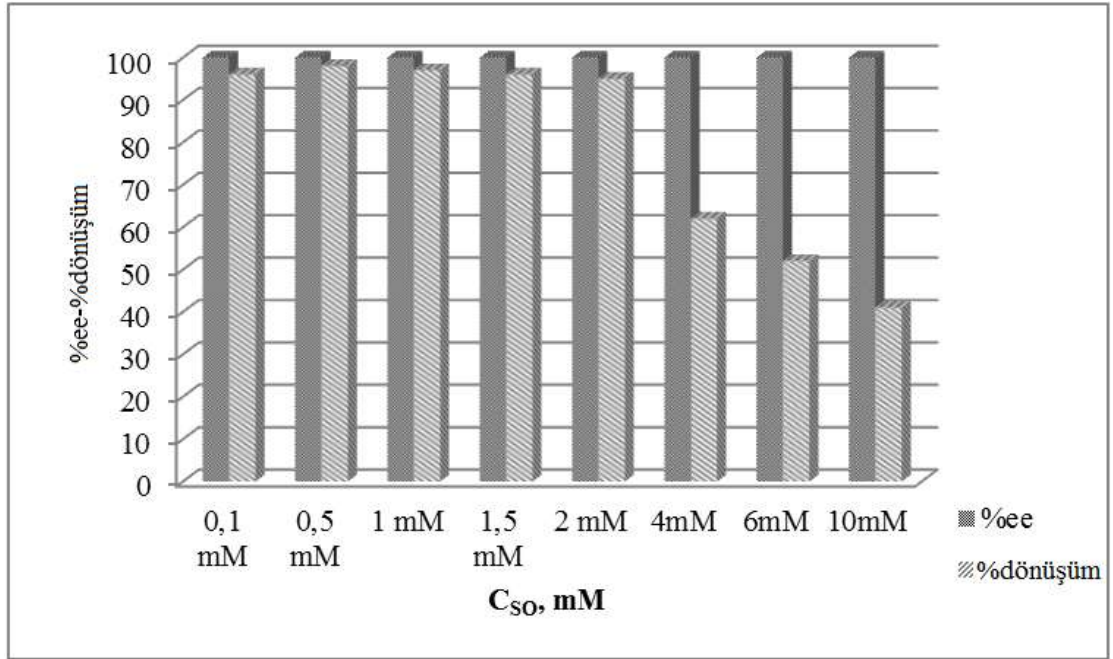
Farklı biyokatalizörler ile yapılan aktivite tayini sonucunda en yüksek aktivitenin taze havuçta olduğu görülmüş ve sonraki deneylerde biyokatalizör olarak havuç kullanılmıştır.

4.2 Asetofenonun Taze Havuç Biyokatalizörlüğünde Biyoindirgenmesi ile Gerçekleştirilen Çalışmalar

Deneyleer substrat olarak belirli derişimde asetofenon ve biyokatalizör olarak belirli derişimde taze havuç içeren 0.1 M sodyum fosfat tampon ortamında gerçekleştirilmiştir. Asetofenon 1 mL MTBE'de çözüldükten sonra tepkime ortamına eklenmiştir. Taze havuç belirli bir boyuta getirilerek kullanılmıştır. Tepkimeler 80 mL hacmindeki vida kapaklı kesikli biyoreaktörlerde, sıcaklık ve karıştırma hızı (150 rpm) kontrol edilen orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. Dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık üzerine, taze havuç biyokatalizörlüğünde başlangıç substrat derişimi, biyotepkime süresi, biyokatalizör derişimi, pH ve sıcaklık etkisi incelenmiştir.

4.2.1 Başlangıç substrat derişimi etkisi

Biyotransformasyon verimi üzerine, taze havuç biyokatalizörlüğünde başlangıç substrat derişimi etkisi 0.1 -10 mM (0.012 – 1.2 g/L) derişim aralığında çalışılmıştır.

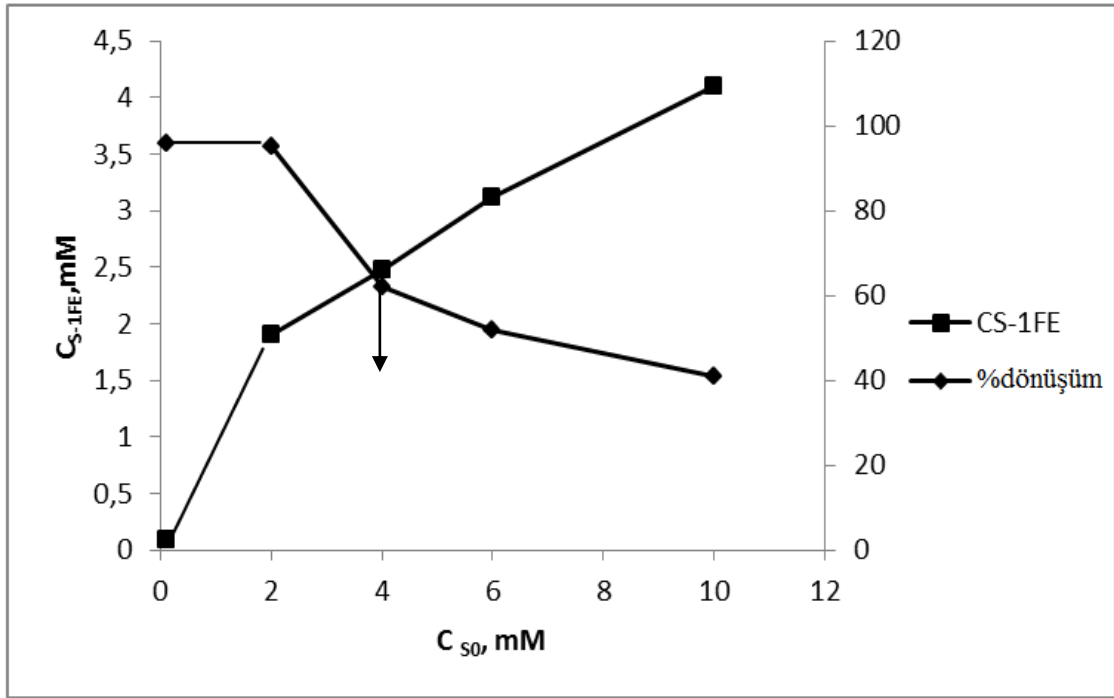


Şekil 4.3 Taze havuç hücreleri için biyoindirgemeye substrat derişimi etkisi
(V=51 mL, C_b=200 g/L, 0,1 M pH=7 fosfat tamponu, t=48 h, T=33 °C)

Şekil 4.3'den başlangıç substrat derişiminin enantiyomerik aşırılık üzerine etkisi olmadığı, dönüşüm değerinin ise etkilendiği gözlenmiştir. 0.1 mM başlangıç substrat derişimindeki % 96 dönüşüm, 10 mM substrat derişiminde % 41'e düşmüştür. Enantiyomerik aşırılık değeri % > 99 olarak sabit kalmıştır.

(S)-1-feniletanol derişiminin substrat derişimi ile değişimi incelendiğinde substrat derişimi arttıkça % dönüşüm azalırken (S)-1-feniletanol derişimi artmaktadır (Şekil 4.4). 2 mM substrat derişiminde % 92 dönüşüm ile 1.9 mM (S)-1-feniletanol elde edilirken 10 mM substrat derişiminde % 41 dönüşüm ile ürün derişimi 4 mM'a ulaşmaktadır.

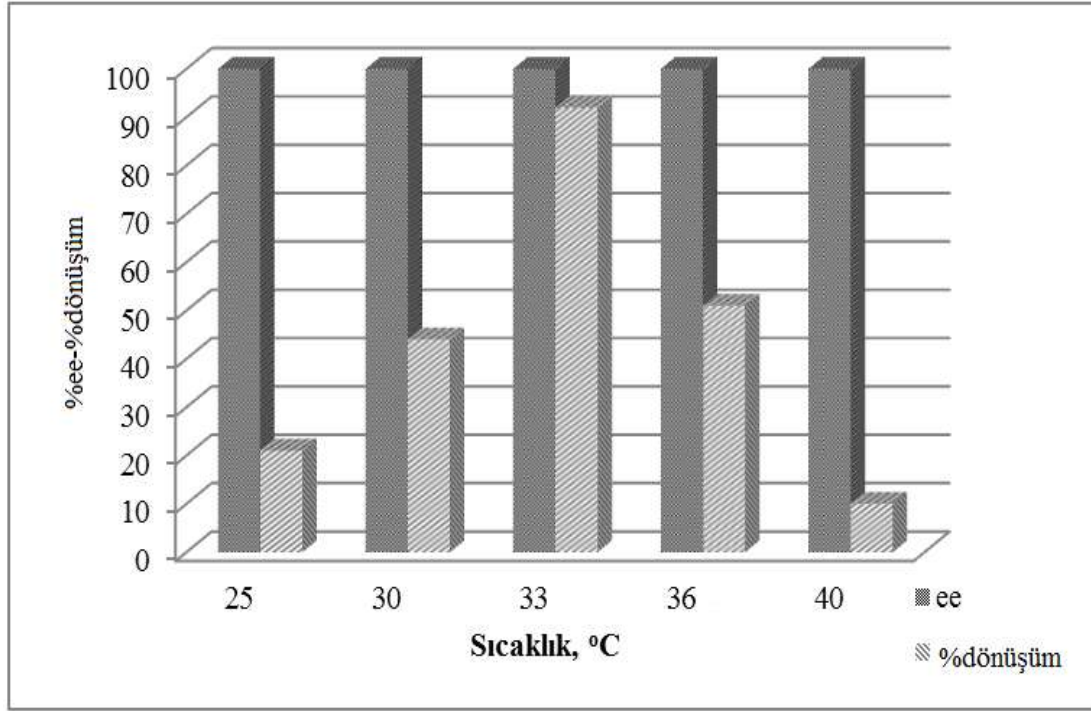
Şekil 4.4’de hem dönüşüm hem de ürün derişimi açısından en uygun substrat derişiminin 4 mM olduğu görülmektedir. Ancak 4 mM substrat derişiminde % 60 dönüşüm ile 2.48 mM ürün elde edilmiştir ve kalan substrat ancak geri döngülü bir sistemde çalışılarak dönüştürülebilir. Substratın hemen hemen tamamı dönüştürüldüğü için kesikli sistemde 2 mM da çalışmak uygundur.



Şekil 4.4 Substrat derişiminin dönüşüm ve ürün derişimi üzerine etkisi ($V=51$ mL, $C_b=200$ g/L, 0,1 M pH=7 fosfat tamponu, $t=48$ h, $T=33$ °C)

4.2.3 Sıcaklık etkisi

Her enzimin aktif olduğu bir optimum sıcaklık aralığı vardır. Yüksek sıcaklık, enzimi deaktive eder. Bu çalışmada, sıcaklık etkisi, 25-40 °C’ler için incelenmiştir

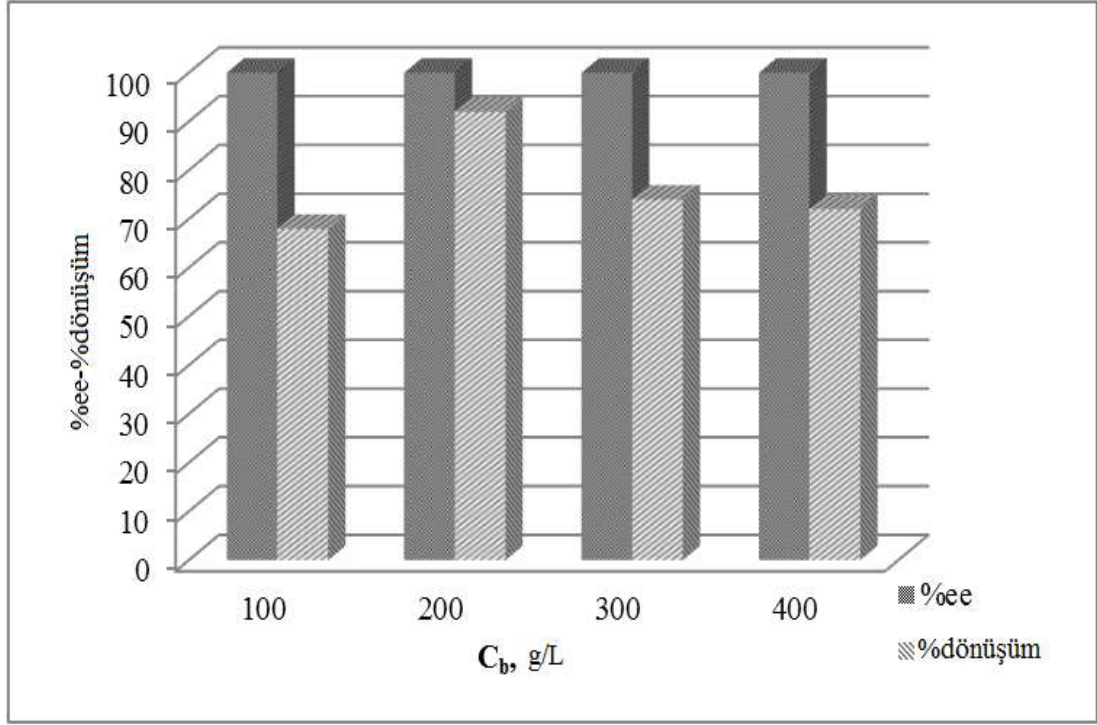


Şekil 4.5 Taze havuç hücreleri için biyoindirmeye sıcaklık etkisi ($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=2\text{ mM}$, $C_b=200\text{ g/L}$, $0,1\text{ M pH}=7$ fosfat tamponu, $t=48\text{h}$)

Şekil 4.5’den de görüldüğü gibi enantiyomerik aşırılık değeri tüm sıcaklıklarda $\% > 99$ iken $33\text{ }^\circ\text{C}$ ’de diğer sıcaklıklara göre daha yüksek dönüşüm elde edilmiştir. Enzimler diğer katalizörlerden farklı olarak protein yapılarından dolayı aktiviteleri sıcaklığa bağlıdır. Belli bir sıcaklıktan sonra enzim denatüre olmaya başlar ve bu nedenle dönüşümün azalması, oksidoredüktaz olan ADH enziminin yüksek sıcaklıkta aktifliğini yitirmesi ile açıklanmıştır. Enzim reaksiyon hızının maksimuma eriştiği sıcaklığa “optimum sıcaklık” denir. Bu tepkime için optimum sıcaklık değeri $33\text{ }^\circ\text{C}$ ’dir.

4.2.4 Biyokatalizör derişimi etkisi

Biyokatalizör derişiminin artması ile tepkimenin nasıl etkilendiği incelenmiştir. Tepkime ortamına; $100 - 400\text{ g/L}$ derişim aralığında taze havuç eklenmiştir.



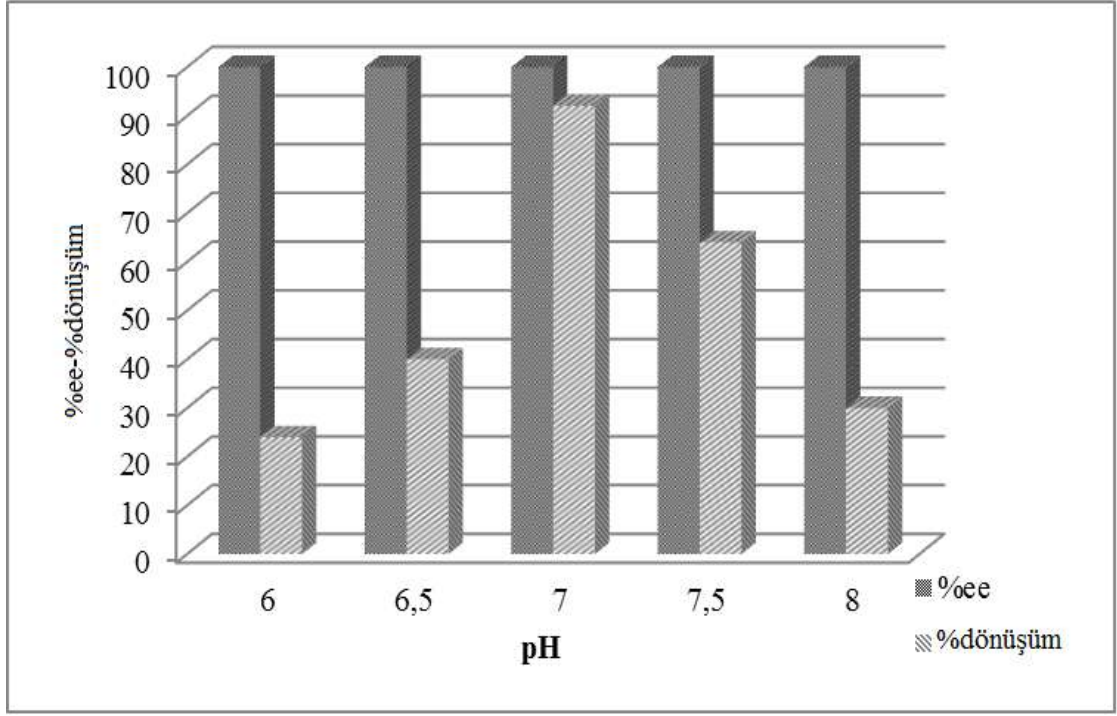
Şekil 4.6 Taze havuç hücreleri için biyoundirgemeye biyokatalizör derişimi etkisi ($V=51$ mL, $C_{SO} = 2$ mM, 0,1 M pH=7 fosfat tamponu, $t=48$ h, $T=33$ °C)

Biyokatalizör derişiminin artması ile enantiyomerik aşırılık değeri etkilenmemiştir (Şekil 4.6). Fakat dönüşüm önce artmış ve 200 g/L hücre derişimi değerinden sonra azalmıştır.

Yüksek biyokatalizör derişimlerinde ortamın yoğun olması nedeniyle oluşan kütle aktarımı kısıtlamaları nedeniyle substratın enzime difüzlenmesi güçleşmiştir. 200 g/L hücre derişimi değerinde yüksek enantiyoseçimliliğe (% >99) ve dönüşüme (% 92) ulaşılmıştır.

4.2.5 pH etkisi

Taze havuç ile biyoundirgeme deneylerinde tepkime pH'sı 6-8 aralığında incelenmiştir.

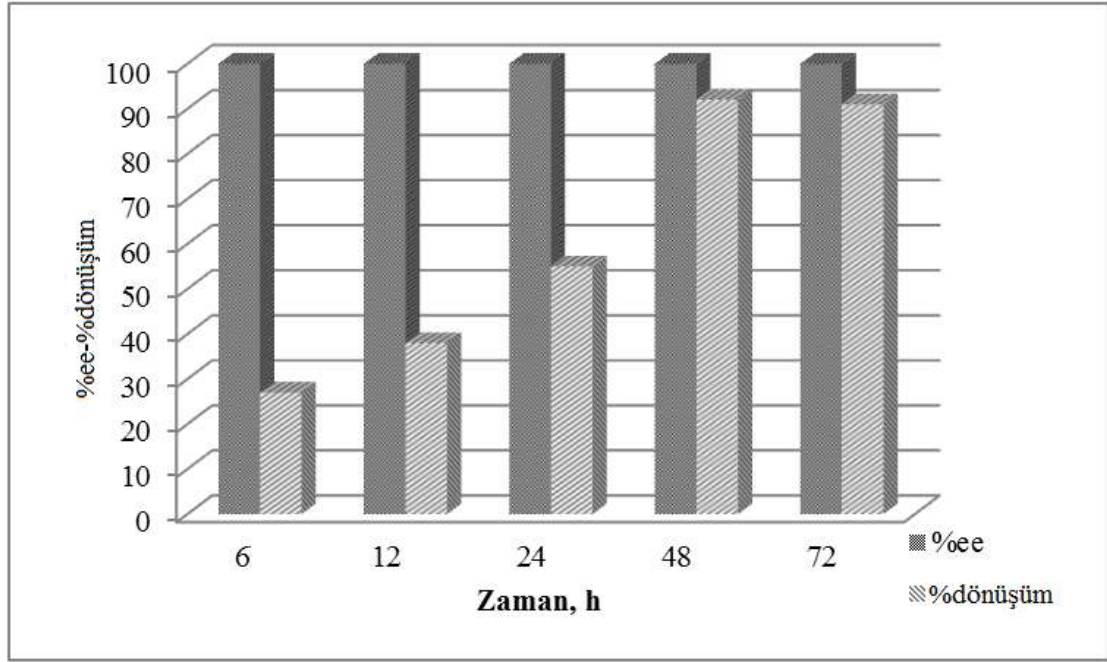


Şekil 4.7 Taze havuç hücreleri için biyoundirgemeye pH etkisi ($V=51\text{mL}$, $C_{SO} = 2\text{ mM}$, $C_b=200\text{g/L}$, $0,1\text{ M}$ fosfat tamponu, $t=48\text{h}$, $T=33^\circ\text{C}$)

Her enzimin en iyi çalıştığı bir pH aralığı vardır. Aşırı asidik ve bazik ortamlardan etkilenirler. Genellikle nötr ortamlarda çalışırlar. Şekil 4.7’de taze havuç için en uygun pH değerinin 7 olduğu görülmüştür. Enantiyomerik aşırılık % >99’dur ve pH’dan etkilenmemektedir. En yüksek % dönüşüm ise pH 7’ de % 92 olarak elde edilmiştir.

4.2.6 Tepkime süresi etkisi

Biyoundirgenme üzerine tepkime süresinin etkisi 6h- 72h aralığında incelenmiştir. Enantiyomerik aşırılık değeri zamanla değişmemiştir.

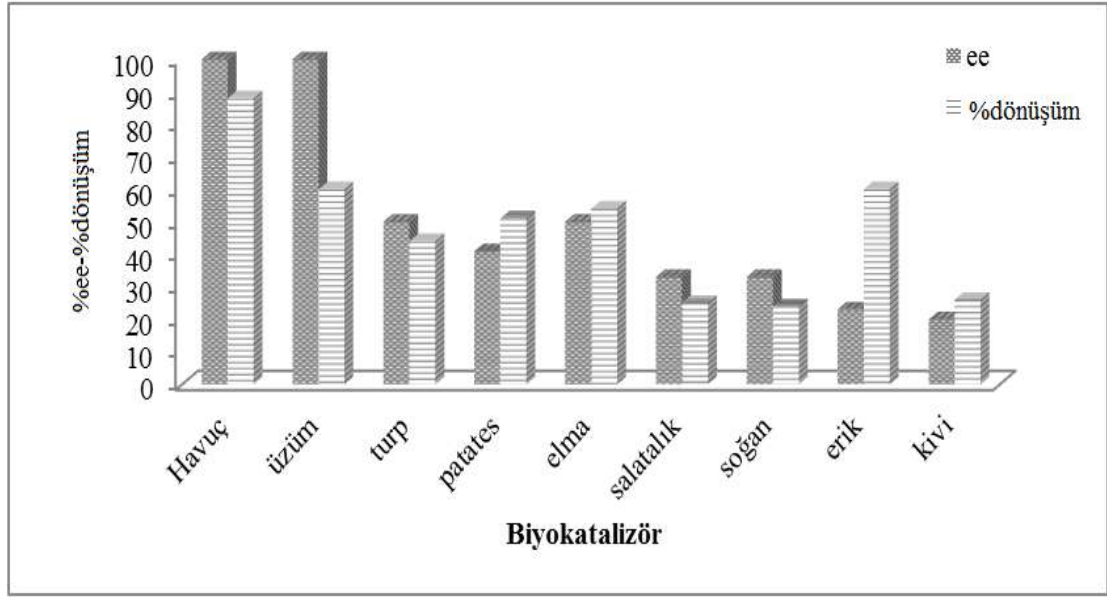


Şekil 4.8 Taze havuç hücreleri için biyoundirgemeye tepkime süresi etkisi ($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=2\text{ mM}$, $C_b=200\text{g/L}$, $0,1\text{ M}$ fosfat tamponu, $T=33^\circ\text{C}$)

Şekil 4.8’ de dönüşüm değeri reaksiyon süresinden etkilenirken enantiyomerik aşırılığın etkilenmediği gözlenmiştir. 48 h sonunda dönüşüm % 92 değerine ulaşmıştır. 72 h sonunda ise fazla bir değişiklik gözlenmemiştir. % >99 ee ve % 92 dönüşüm değerine ulaşılan 48 h’in en uygun çalışma süresi olduğuna karar verilmiştir.

4.2.7 Farklı biyokatalizörlerin etkisi

Bu aşamaya kadar ADH aktivitesinin yüksek olması nedeniyle seçilen havuç biyokatalizörü ile biyoundirgenme deneyleri gerçekleştirilerek optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Farklı biyokatalizörler ile aynı koşullarda yapılan biyoundirgenme tepkimesi deneylerinde elde edilen % dönüşüm ve % ee değerleri şekil 4.9’da gösterilmiştir.

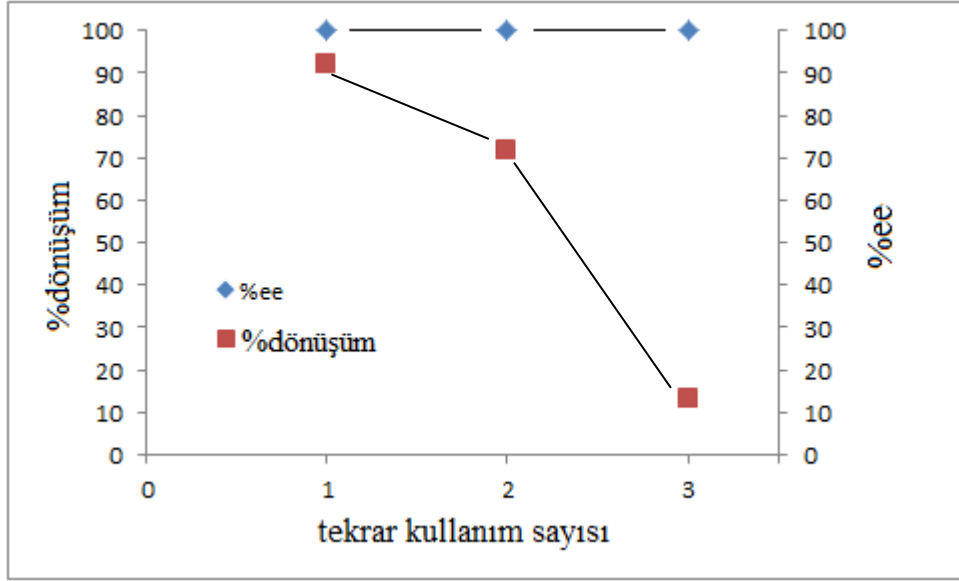


Şekil 4.9 Farklı biyokatalizörlerin biyoindirgenmeye etkisi ($V=51\text{ mL}$, $C_{SO}=2\text{ mM}$, $C_b=200\text{ g/L}$, 0.1 M pH=7 fosfat tamponu, $t=48\text{ h}$, $T=33\text{ }^\circ\text{C}$)

Taze havuç ve üzüm dışındaki biyokatalizörler ile gerçekleştirilen biyoindirgenme deneylerinde enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm değerleri oldukça düşük bulunmuştur. Yüksek enantiyomerik aşırılık değerlerine taze havuç ve üzüm biyokatalizörleri ile ulaşılmıştır. Fakat taze havuç biyokatalizörü ile gerçekleştirilen biyoindirgenme tepkimesi sonucu % 88 dönüşüm, üzüm biyokatalizörü ile % 60 dönüşüm elde edildiği için havuç biyokatalizörlüğünde çalışmanın daha uygun olduğu görülmüştür.

4.2.8 Bitki biyokatalizörünün yeniden kullanılabilirliği

Biyotransformasyon ile asetofenonun asimetric sentez ile indirgenmesi sonucu elde edilen (S)-1-feniletanol üretiminde kullanılan biyokatalizör, her kullanım sonrası saf sudan geçirilerek tekrar yeni tepkime ortamına biyokatalizör olarak eklenmiştir. Kullanım sayısına bağlı olarak enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm arasındaki ilişki incelenmiştir. Şekil 4.10'dan da görüleceği gibi ilk kullanımda % 92 dönüşüm ve % >99 ee elde edilirken, ikinci kullanımda dönüşüm değeri % 70 ve üçüncü kullanımda % 10 değerine kadar düşmüştür. İlk kullanımdan sonra dönüşüm değerinde keskin bir düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.10 Taze havuç hücrelerinin tekrar kullanım sayısı ($V=51$ mL, $C_{SO} = 2$ mM, $pH=7$, 0.1 M fosfat tamponu)

Yadav vd. (2008), biyokatalizör olarak havuç bitki hücreleri kullanılarak tetrahydropyranollerin enantioseçimli indirgenmesinin gerçekleştirildiği çalışmada % 83 - 94 ee aralığında (S)-alkoller elde etmişlerdir. Bu çalışmada (S)-alkoller % >99 ee ile elde edilmiştir.

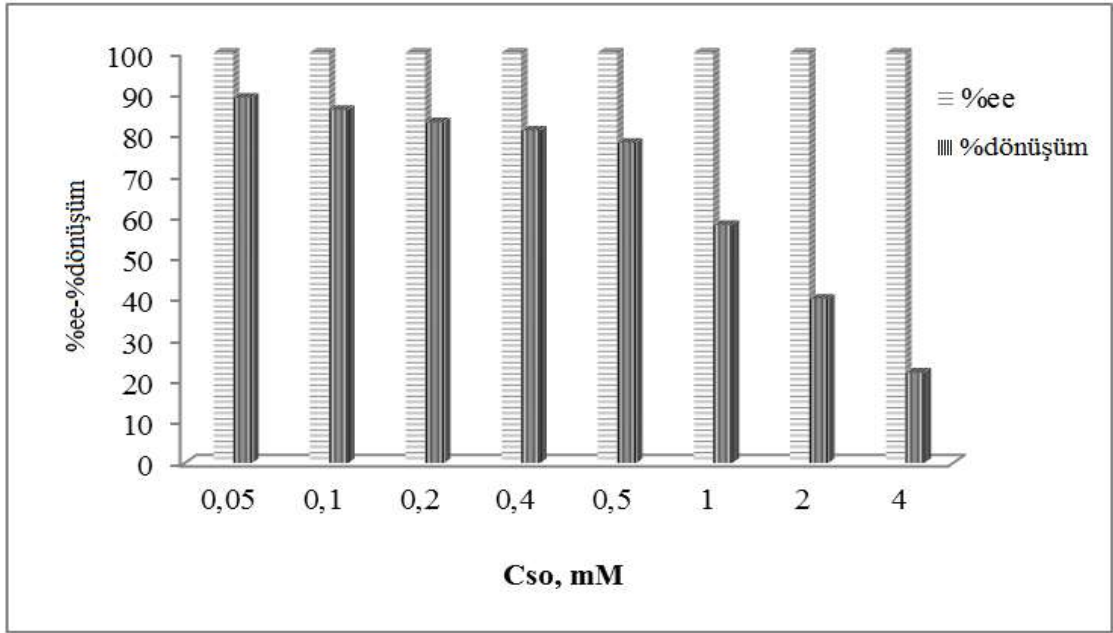
4.3 Asetofenonun Liyofilize Havuç Biyokatalizörlüğünde Asimetrik İndirgenmesi ile Gerçekleştirilen Çalışmalar

4.3.1 Dondurarak kurutma

Endüstriyel uygulamalarda aynı aktiviteye sahip biyokatalizör ile üretim yapmak önemlidir. Ancak taze havucun kaynağına bağlı olarak ADH aktivitesi değişebilir. Bu nedenle aynı kaynaktan alınıp liyofilize ederek çalışmak gerekir. Bu amaçla taze havuç 0.024 mBar ve $-50^{\circ}C$ de 24 h dondurarak kurutulmuş ve liyofilize havuç elde edilmiştir.

4.3.2 Başlangıç substrat derişimi etkisi

Biyotransformasyon verimi üzerine, liyofilize havuç biyokatalizörlüğünde başlangıç substrat derişimi etkisi 0.05-4 mM (0.06-0.48 g/L) derişimlerinde çalışılmıştır. Başlangıçta 100 g olan taze havuç liyofilizasyona uğradıktan sonra yaklaşık 15 g olarak tartılmıştır. Serbest havuç deneyleri ile karşılaştırabilmek için tepkime ortamına her defasında 30 g/L liyofilize havuç eklenmiştir.



Şekil 4.11 Liyofilize havuç hücreleri için biyoindirgemeye substrat derişimi etkisi (V=51mL, C_{bl}=30 g/L, 0.1 M pH=7 fosfat tamponu, t=48h, T=33 °C)

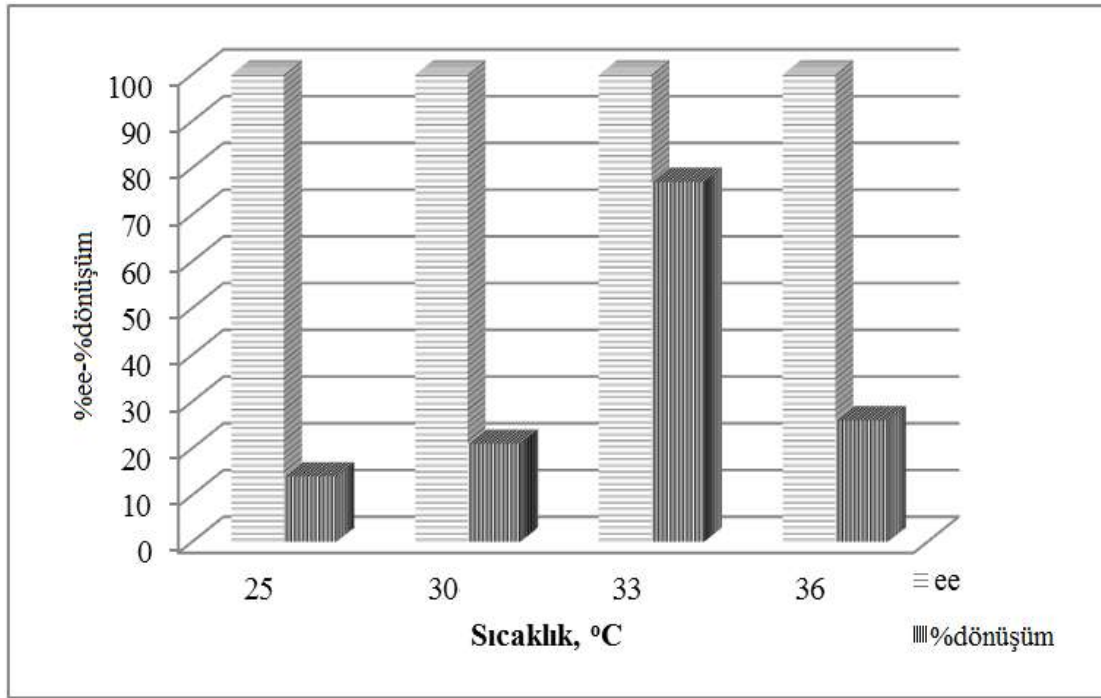
Şekil 4.11’de substrat derişimi arttıkça ee değişmezken dönüşümün azaldığı görülmektedir. 0.5 mM substrat derişiminde yüksek enantiyoseçimliliğe % > 99 ve dönüşüme % 78 sahiptir.

Taze havuç ile aynı koşullarda yapılan deney sonuçları karşılaştırıldığı zaman, taze havuç biyokatalizörlüğünde 2 mM substrat derişiminde ise % 92 dönüşüm ve % > 99 ee elde edilirken, liyofilize havuç ile 2 mM substrat derişiminde % 40 dönüşüm ve % >99 ee elde edildiği görülmektedir.

Uygulanan dondurma hızı, kurutulmuş ürünün rehidrasyon özellikleri için son derece önemlidir. Dondurma işlemi ne kadar hızlı olursa, o kadar küçük ve fazla sayıda buz kristali oluşacağından, kurumuş üründe o kadar fazla gözenek ortaya çıkar. Böylece ürünün rehidrasyon hızı yüksek ve tamdır. Bu çalışmada uygulanan kurutma hızı yavaş olduğundan yüksek enantiyoseçimlilik % >99 elde edilmesine rağmen maksimum dönüşüm % 78 değerinde kalmıştır.

4.3.3 Sıcaklık etkisi

Bu çalışmada, sıcaklık etkisi, 25-40 °C'ler için incelenmiştir. Çalışılan sıcaklıklarda enantiyomerik aşırılık değeri % >99 iken, 33 °C'de diğer sıcaklıklara göre daha yüksek dönüşüm elde edilmiştir. Burada, 0.5 mM substrat derişiminde çalışılmıştır ve dönüşüm % 78' dir (Şekil 4.12).



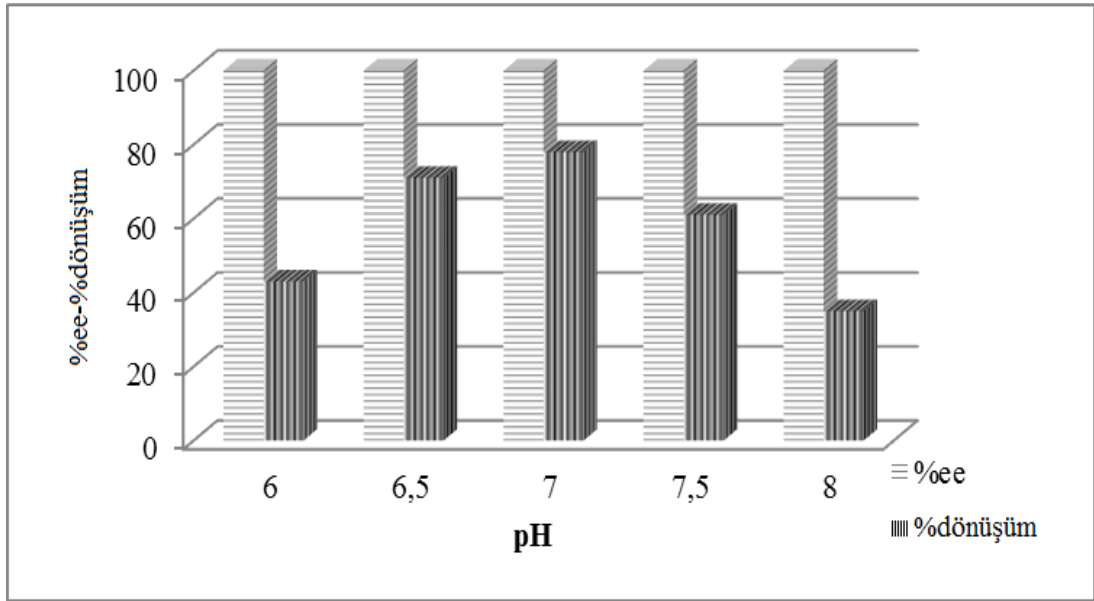
Şekil 4.12 Liyofilize havuç biyokatalizörü için biyoundirgemeye sıcaklık etkisi
(V=51mL, C_{SO} =0.5 mM, C_{bl} =30 g/L, 0.1 M pH=7 fosfat tamponu, t=48h)

Şekil 4.12'den de görüldüğü gibi, sıcaklık belli bir değere kadar artmış ve sonra azalmıştır. Enzimler diğer katalizörlerden farklı olarak protein yapılarından dolayı aktiviteleri sıcaklığa bağlıdır. Belli bir sıcaklıktan sonra enzim denatüre olmaya

başlar ve bu nedenle dönüşümün azalması, oksido redüktaz olan ADH enziminin yüksek sıcaklıkta aktifliğini yitirmesi ile açıklanmıştır.

4.3.4 pH etkisi

Liyofilize havuç ile biyoindirgeme deneylerinde pH etkisi 6 – 8 aralığında incelenmiştir (Şekil 4.13).

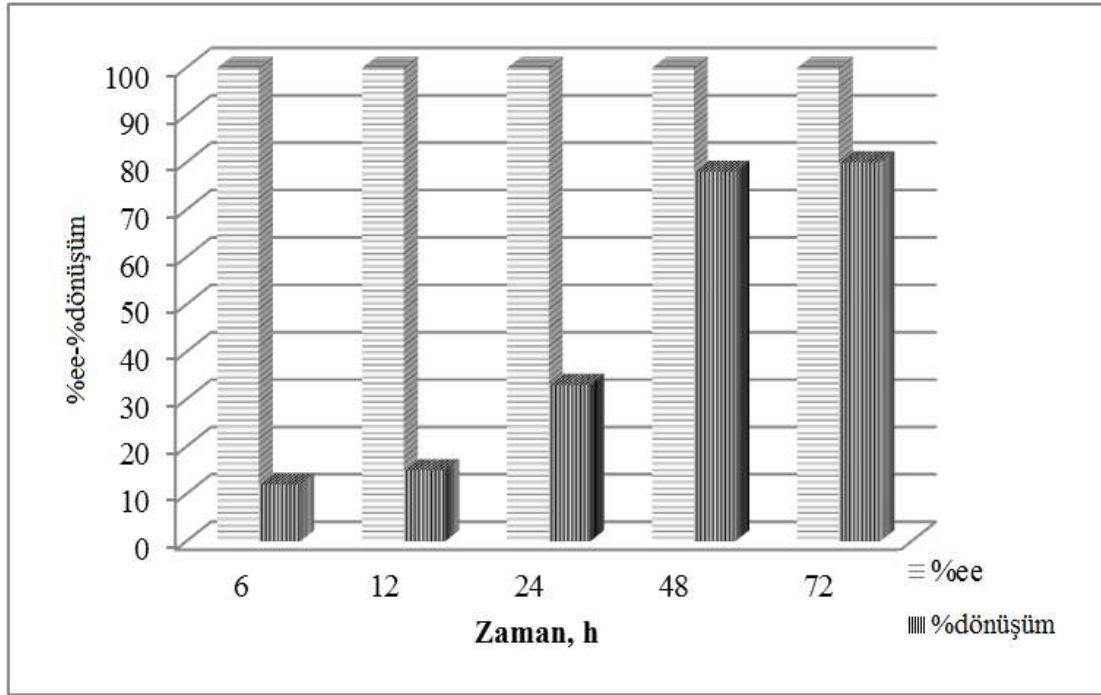


Şekil 4.13 Liyofilize havuç hücreleri için biyoindirgemeye pH etkisi ($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=0.5\text{ mM}$, $C_{bl}=30\text{ g/L}$, 0.1 M fosfat tamponu, $t=48\text{h}$, $T=33\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Tepkime ortamda dönüşüm açısından en uygun pH değeri 7'dir. Enantiyomerik aşırılık % >99'dur ve pH'dan etkilenmemektedir. Her enzimin en iyi çalıştığı bir pH aralığı vardır. Aşırı asidik ve bazik ortamlardan etkilenirler. Genellikle nötr ortamlarda çalışırlar. Bazı hallerde enzimler en yüksek pH etkinliğini belirli bir pH derecesinde gösterirler. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir. Bu çalışmada taze ve liyofilize havuç için optimum pH değerinin 7 olduğu görülmüştür.

4.3.5 Tepkime süresi etkisi

Biyotransformasyon verimi üzerine, liyofilize havuç biyokatalizörlüğünde biyotepkime süresi etkisi 6h- 72h için incelenmiştir. Her koşulda enantiyomerik aşırılık % >99'dur. Dönüşüm yüzdesi ise zamanla artmış ve 48 h sonrasında fazla değişmemiştir (Şekil 4.14).



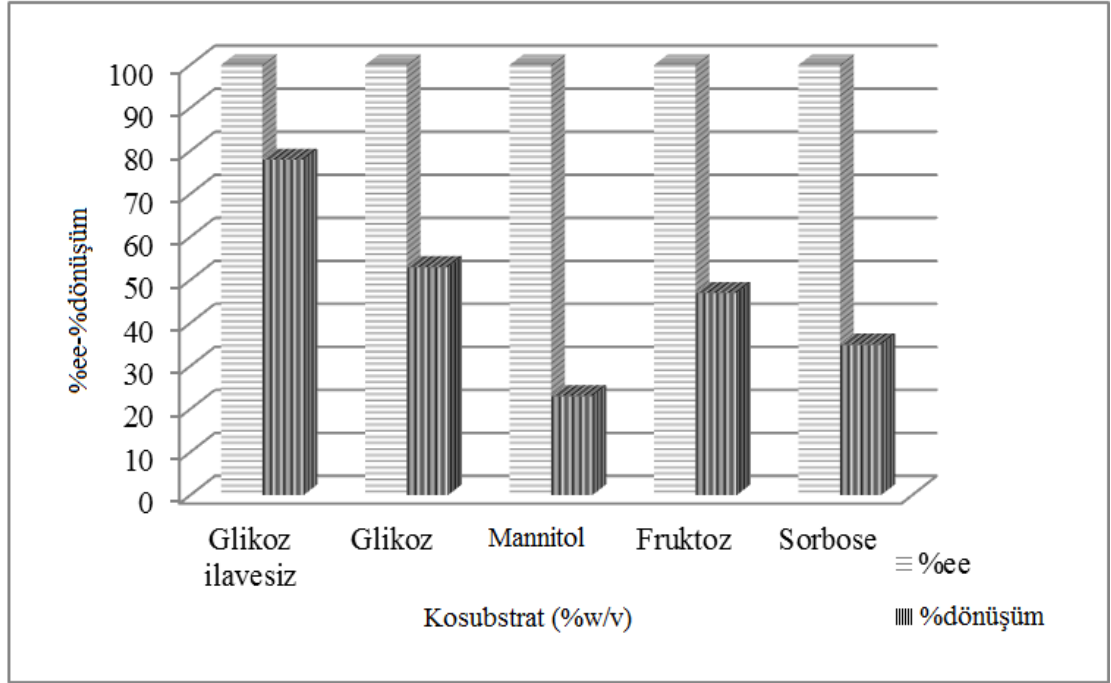
Şekil 4.14 Liyofilize havuç hücreleri için biyoindirmeye süre etkisi
($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=0.5\text{ mM}$, $C_{bl}=30\text{ g/L}$, 0.1 M fosfat tamponu, $T=33\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Yadav vd. (2009), yapmış oldukları çalışmada, asetofenon türevlerini de, liyofilize bezelye biyokatalizörlüğünde, kiral alkollerine % 91-98 aralığında değişen enantiyomerik aşırılık değerleri ile indirgemişlerdir. Bu çalışmada (S)-alkoller % >99 ee ile elde edilmiştir.

4.3.6 Kofaktör rejenerasyonu

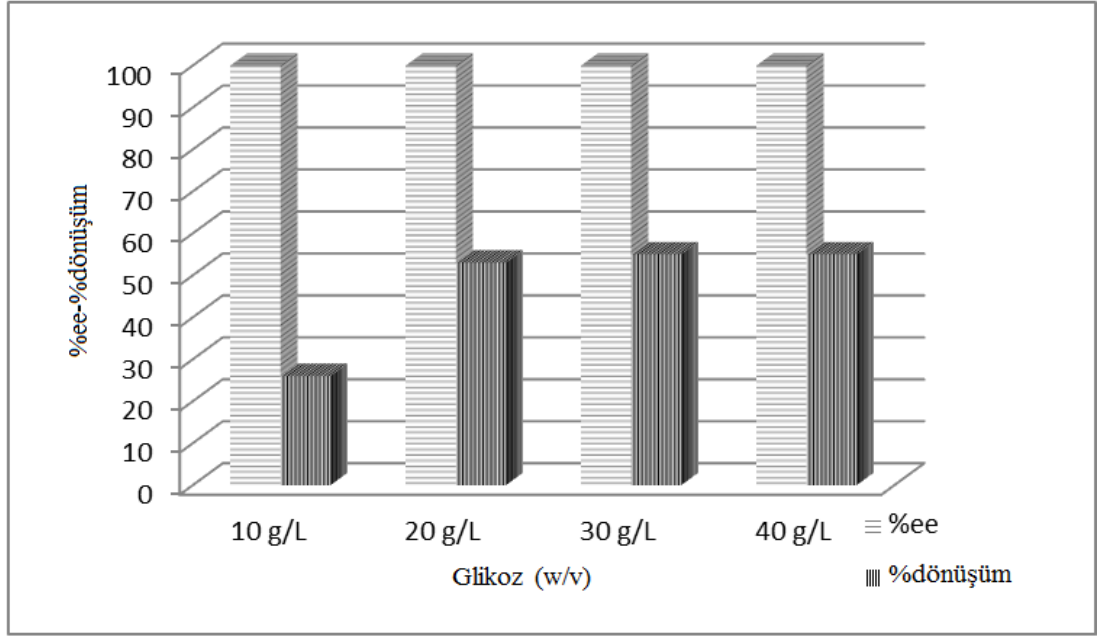
Dört farklı kosubstrat (glukoz, früktoz, sorbose, mannitol) eşliğinde kofaktör rejenerasyonu için liyofilize havuç ile deneyler yapılarak kofaktör ihtiyacı

incelenmiştir. Çalışmada, her bir kosubstrat öncelikle 110 mM olarak tepkime ortamına ilave edilmiştir. Sonra glikoz ile kofaktör rejenerasyonu için, tepkime ortamına farklı miktarlarda glikoz (55-222 mM) ilave edilmiştir.



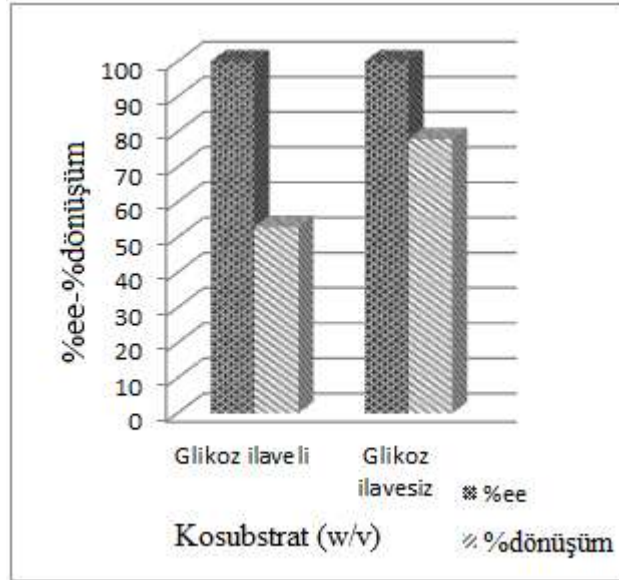
Şekil 4.15 Kofaktör rejenerasyonu etkisi ($V=51$ mL, $C_{SO}=0.5$ mM, $C_{bl}=30$ g/L, 0.1 M fosfat tamponu, $t=48$ h, $T=33$ °C, $C_{ks}=110$ mM)

Tepkime ortamına eklenen kosubstratlardan sadece glikoz ile yüksek % >99 ee ve % 53 dönüşüm değerlerine ulaşılmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.16 Glikozun etkisi ($V=51\text{mL}$, $C_{SO}=0.5\text{ mM}$, $C_{bl}=30\text{ g/L}$, 0.1 M fosfat tamponu, $t=48\text{h}$, $T=33\text{ }^\circ\text{C}$, $C_{ks}=55\text{-}222\text{ mM}$ glikoz)

Şekil 4.16'dan tepkime ortamına eklenen glikoz miktarının enantiyomerik aşırılık (ee) değerini etkilemediği, dönüşüm (c) değerini ise azalttığı görülmüştür.



Şekil 4.17 Glikoz ilavesiz tepkime ortamı ($V=51\text{ mL}$, $C_{SO}=0.5\text{ mM}$, $C_{bl}=30\text{ g/L}$, 0.1 M fosfat tamponu, $t=48\text{ h}$, $T=33\text{ }^\circ\text{C}$)
 Glikoz ilaveli ($V=51\text{ mL}$, $C_{SO}=0.5\text{ mM}$, $C_{bl}=30\text{ g/L}$, 0.1 M fosfat tamponu, $t=48\text{ h}$, $T=33\text{ }^\circ\text{C}$, $C_{ks}=160\text{ mM}$)

Biyokatalizör olarak liyofilize havucun kullanıldığı biyoindirgenme tepkimeleri sonucunda enantiyomerik aşırılık % >99 dönüşüm ise % 78 olarak elde edilmiştir. Bu değerler liyofilize havuç biyokatalizörlüğünde tepkime ortamına eklenen glikoz ile ulaşılan değerlerden (% >99 ee, % 53 dönüşüm) daha yüksek olup, bitki hücrelerinin kofaktöre ihtiyaç duymadıkları açık olarak görülmektedir (Şekil 4.17).

Alkol dehidrojenazlar kofaktöre ihtiyaç duyar ve kofaktörler oldukça pahalı maddelerdir. Tepkime ilerledikçe ortamdaki kofaktör tükeneceğinden ve kofaktörler pahalı olduklarından, saf enzimler yerine bitkileri, alkol dehidrojenaz kaynağı olarak kullanmak daha ekonomiktir. Bitki hücresinde bulunan GDH enzimi ve glikoz molekülü kofaktör rejenerasyonunu sağlayabilir.

Tüm hücre biyokatalizörleri (whole-cell) genellikle kararludur ve kofaktör rejenerasyonunu dışardan bir kofaktör eklemeye gerek kalmadan içeriğindeki indirgenmiş şekerlerle yapabilmektedir.

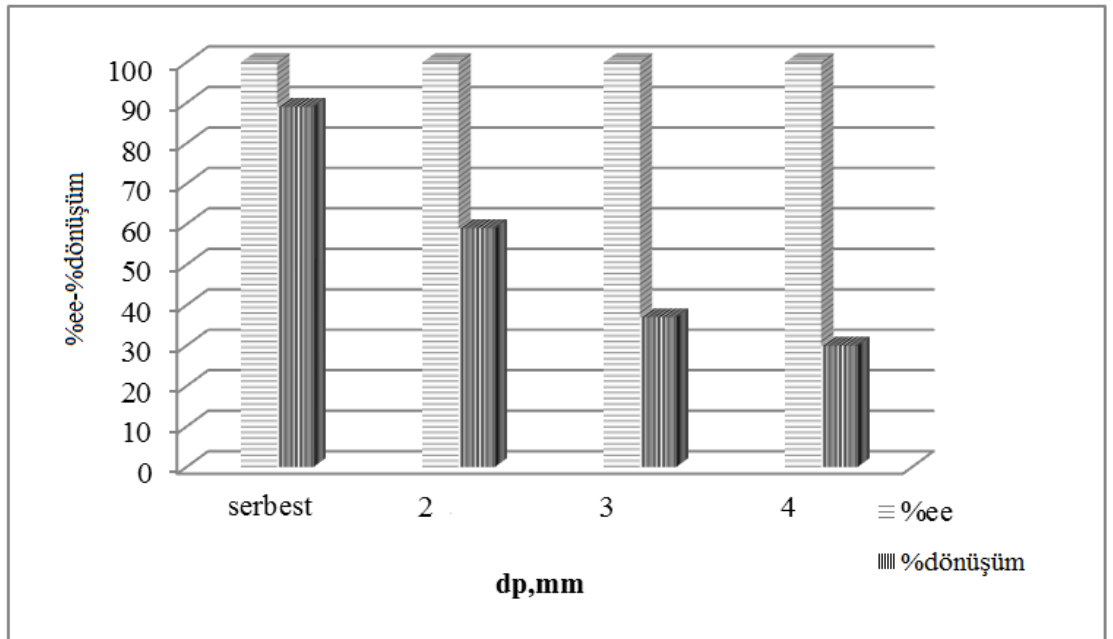
Asetofenonun bitki biyokatalizörlüğünde asimetrik biyoindirgenmesi ile (S)-1-feniletanol üretiminin amaçlandığı bu çalışmada kullanılan havuç sebzesi, yüksek şeker oranına sahiptir. Kofaktöre ihtiyaç duymadan, ılımlı koşullarda gerçekleşen ve ilaç sanayiinde önemli bir ara ürün olan (S)-1-feniletanol'ün yüksek enantimerik saflıkta eldesi bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir.

4.4 Tutuklanmış Taze Havuç Hücreleri ile Kesikli Sistemde Gerçekleştirilen Deneyler

Tutuklanmış enzimler, serbest enzimlere göre daha stabil olmaları, tekrar tekrar kullanılabilirlikleri ve sürekli sistemde kullanımlarının uygun olması açısından önemli avantajlara sahiptirler. Tutuklanmış taze havuç hücreleri, Bölüm 2'de anlatılan yöntem ile elde edilmiştir.

4.4.1 Pellet çapı etkisi

Tutuklama işleminde pellet çapının, (S)-1-feniletanol üretimine etkisini incelemek için % 2 w/v' lik Na-aljinat çözeltisinden elde edilen 3 farklı pellet çapına sahip tutuklanmış taze havuç hücreleri kullanılmıştır. Tutuklu hücrenin yapısının dağılmaması için, tampon ortamına, 0.05 M CaCl₂ eklenmiştir. Enzimi farklı pellet çaplarında tutuklayarak (2mm-3mm-4mm) pellet çapı- enantiyomerik aşırılık-dönüşüm arasındaki ilişki incelenmiştir.

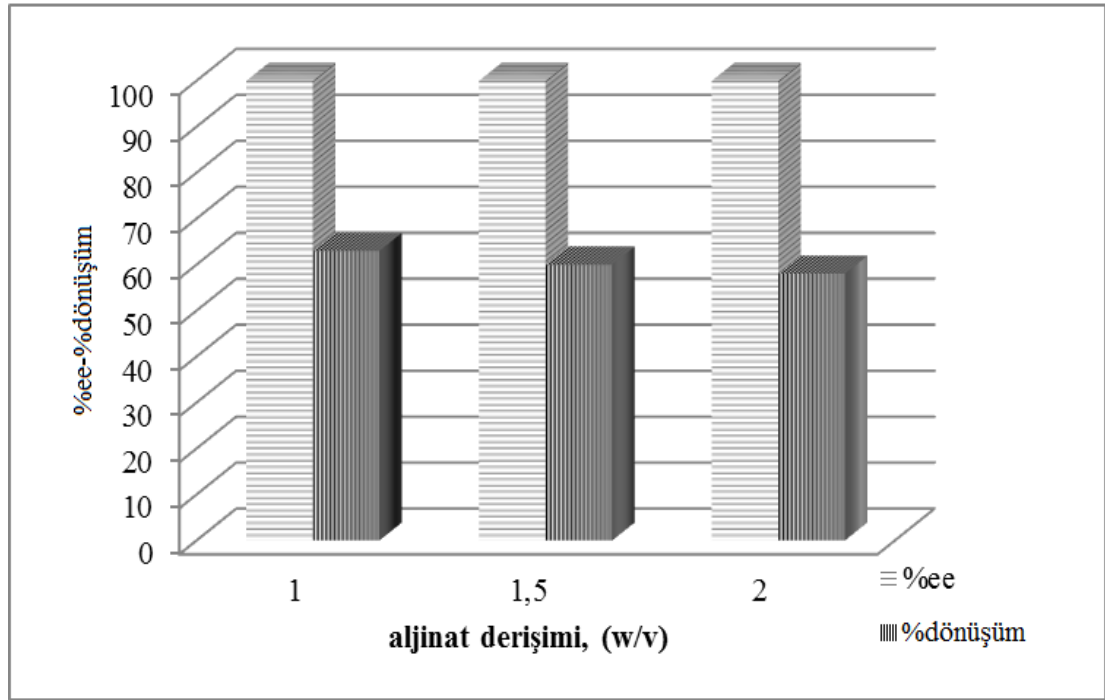


Şekil 4.18 Tutuklanmış taze havuç hücreleri ile pellet çapı etkisi ($C_{SO}=2$ mM, $C_{Alj}=\%2$ w/v, $C_{bt}=200$ g/L, $V=51$ mL, 0.1 M pH=7 fosfat tamponu, $C_{CaCl_2}=0.05$ M, $t=48$ h, $T=33$ °C, $N=150$ rpm)

Şekil 4.18' den de görüldüğü gibi, tutuklanmış havuç ile 2 mm pellet çapında % 59 dönüşüm ve % >99 ee elde edilirken, taze havuç ile aynı substrat derişiminde yapılan deneyler sonucunda % 89 dönüşüm ve % >99 ee elde edilmiştir. Tutuklama işleminin getirdiği ilave kütle aktarım kısıtlamaları nedeniyle kesikli sistemde olumlu bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

4.4.2 Aljinat Derişimi Etkisi

Kalsiyum aljinat jelinin dayanıklılığını etkileyen başlıca faktörler aljinatın tipi, polimer konsantrasyonu ve CaCl_2 çözeltisinin konsantrasyonudur. Jelin parçalanıp çözülmesi substrat çözeltisine Ca^{2+} ilavesi ile engellenebilir (Cheetham vd.. 1979). Aljinat derişimi 1, 1.5, 2 (w/v) olacak şekilde hazırlanmıştır.

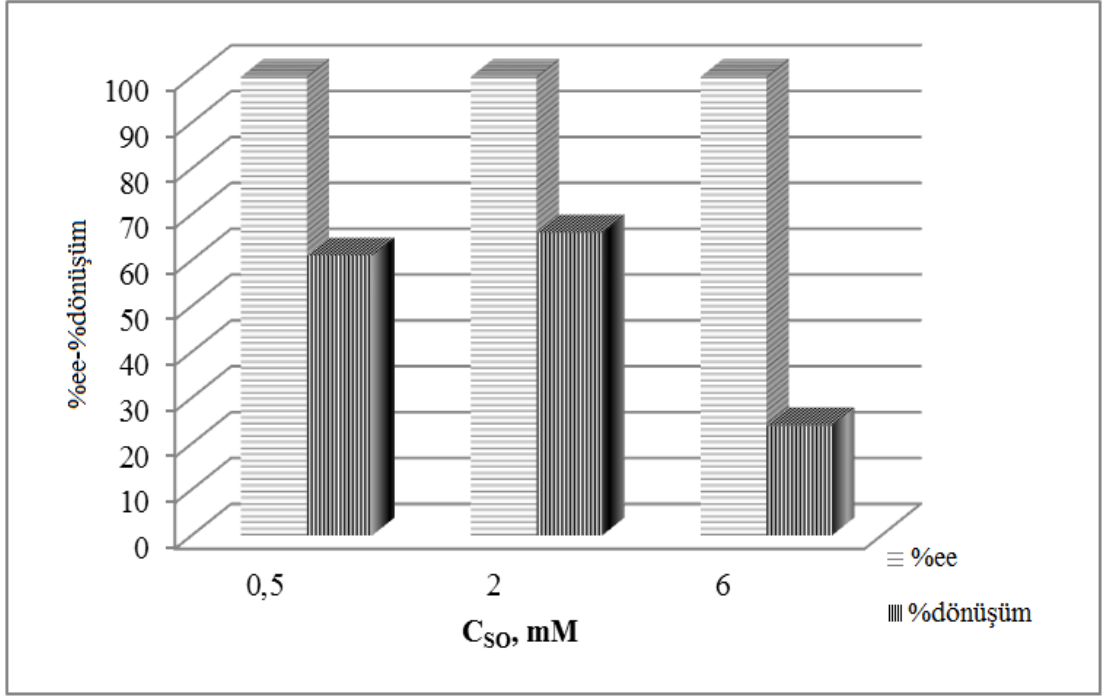


Şekil 4.19 Tutuklanmış taze havuç hücreleri ile aljinat derişimi etkisi ($C_{\text{SO}}=2\text{mM}$, $d_p=2\text{ mm}$, $C_{\text{bt}}=200\text{ g/L}$, $V=51\text{ mL}$, 0.1 M pH=7 fosfat tamponu, $C_{\text{CaCl}_2}=0.05\text{ M}$, $t=48\text{ h}$, $T=33\text{ }^\circ\text{C}$, $N=150\text{ rpm}$)

Şekil 4.19'dan da görüldüğü gibi artan aljinat derişimi ile enantiyomerik aşırılık değeri etkilenmezken, dönüşümün difüzyon kısıtlamaları nedeni ile nispeten azaldığı gözlenmiştir. % 1 aljinat derişiminde % >99 ee ve % 63 dönüşüm elde edilmiştir. Düşük aljinat derişimlerinde pellet yapının çabuk dağıldığı gözlemlendiği için dönüşümü % 58 olan % 2 (w/v) aljinat derişiminde çalışılmıştır.

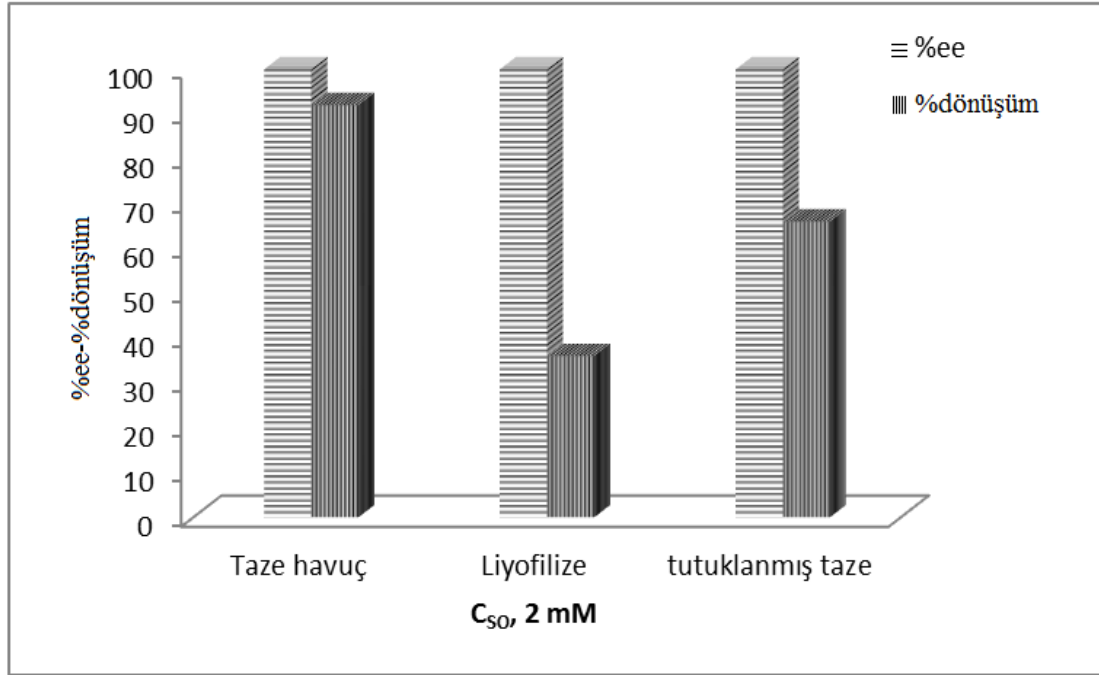
4.4.3 Başlangıç substrat derişimi etkisi

Enzim kaynağı (ADH) olarak kullanılan tutuklanmış taze havuç, (S)-enantiyomer açısından 2 mM (0.24 g/L) derişimde yüksek enantiyoseçimliliğe (% >99) sahiptir. Dönüşüm değeri % 66 olarak elde edilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 Tutuklanmış taze havuç hücreleri için biyoundirgemeye substrat derişimi etkisi (dp=2 mm, C_{bt}=200 g/L, C_{Aij}=% 2 w/v, V=51 mL, 0.1 M pH=7 fosfat tamponu, C_{CaCl2}=0.05 M, t=48 h, T=33 °C, N=150 rpm)

Serbest taze havuç ve liyofilize havuç ile karşılaştırıldığı zaman aynı koşullarda 2 mM serbest havuç için % 92 ve liyofilize havuç için % 36 dönüşüm değerine karşı tutuklanmış havuç için % 66 dönüşüm elde edilmiştir (Şekil 4.20).

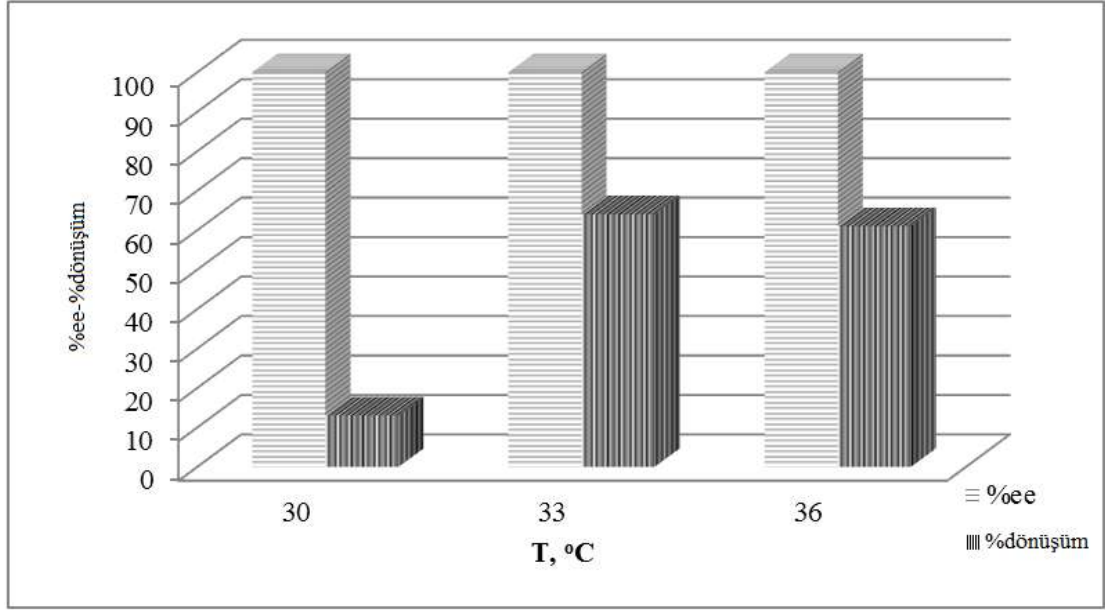


Şekil 4.21 Taze havuç, liyofilize havuç ve tutuklanmış taze havuç için %ee-% dönüşüm

Şekil 4.20 - 4.21'den görüldüğü gibi, aljinat derişimi ve başlangıç substrat derişiminin artması dönüşümü olumlu yönde etkilememiştir. Tutuklanmış taze havuç biyokatalizörü ile (S)-1 feniletanol üretimine tepkime sıcaklığı, ortam pH'sı ve tepkime süresi gibi etkiler incelenmiştir.

4.4.4 Sıcaklık etkisi

Tutuklanmış taze havuç ile biyoindirgenme deneylerinde sıcaklık etkisi incelendiğinde, en yüksek dönüşüm % 64 ve ee % >99 değeri 33 °C'de elde edilmiştir (Şekil 4.22).

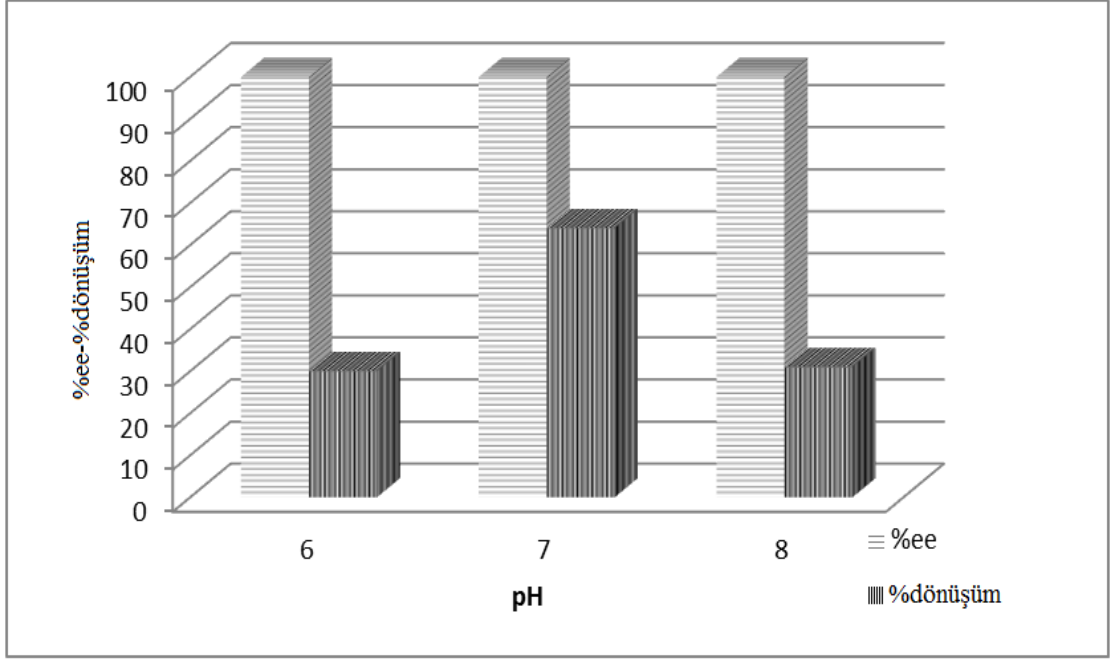


Şekil 4.22 Tutuklanmış taze havuç biyokatalizörü için biyoindirmeye sıcaklık etkisi ($C_{SO} = 2$ mM, $d_p = 2$ mm, $C_{bt} = 200$ g/L, $C_{Alj} = \% 2$ w/v, $V = 51$ mL, 0.1 M pH=7 fosfat tamponu, $C_{CaCl_2} = 0.05$ M, $t = 48$ h, $N = 150$ rpm)

Şekil 4.22'den görüldüğü üzere, tutuklama işlemi sonucunda 36 °C'de dönüşümün fazla azalmadığı gözlenmiştir. Oluşan sıcaklık gradyeni nedeni ile hücrelerin dış ortam sıcaklığından daha az etkilendiği gözlenmiştir.

4.4.5 pH etkisi

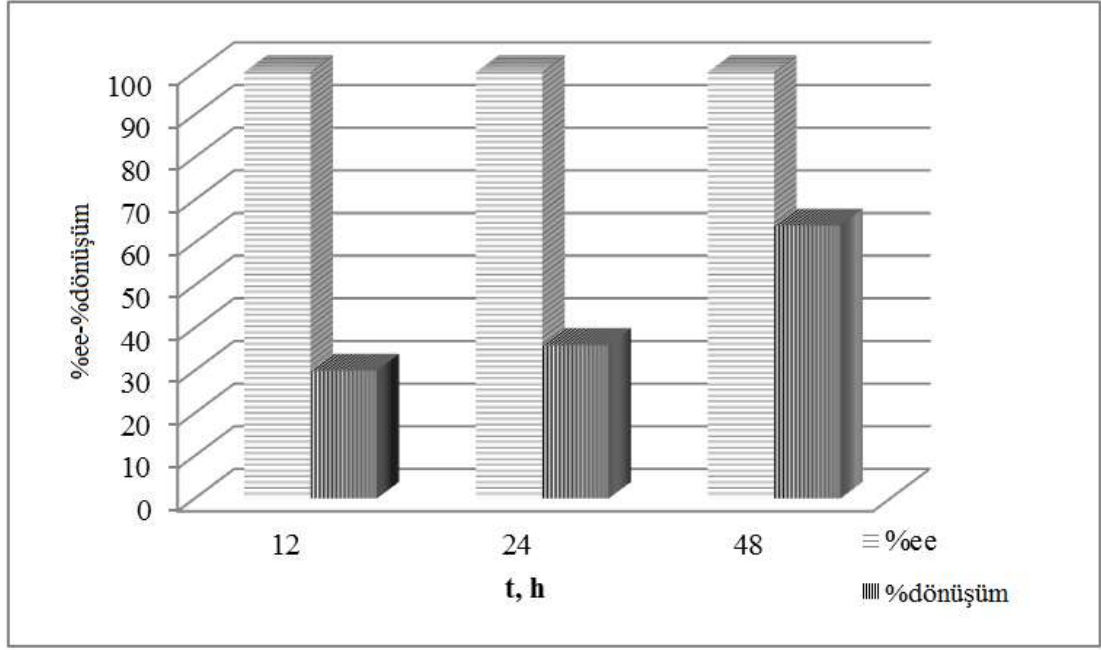
Tutuklanmış taze havuç ile biyoundirgenme deneylerinde pH etkisi incelenirken, en yüksek dönüşüm % 64 ve % ee >99 değeri pH=7 de elde edilmiştir.



Şekil 4.23 Tutuklanmış taze havuç hücreleri için biyoundirgemeye pH etkisi
($C_{SO} = 2$ mM, $d_p = 2$ mm, $C_{bt} = 200$ g/L, $C_{Alj} = 2$ w/v, $V = 51$ mL, 0.1 M fosfat tamponu, $C_{CaCl_2} = 0.05$ M, $t = 48$ h, $T = 33$ °C, $N = 150$ rpm)

4.4.6 Tepkime süresi etkisi

Tutuklanmış taze havuç ile biyoundirgenme deneylerinde süre etkisi incelenirken, en yüksek % 64 dönüşüm ve % >99 ee değeri 48 h sonunda elde edilmiştir (Şekil 4.24).

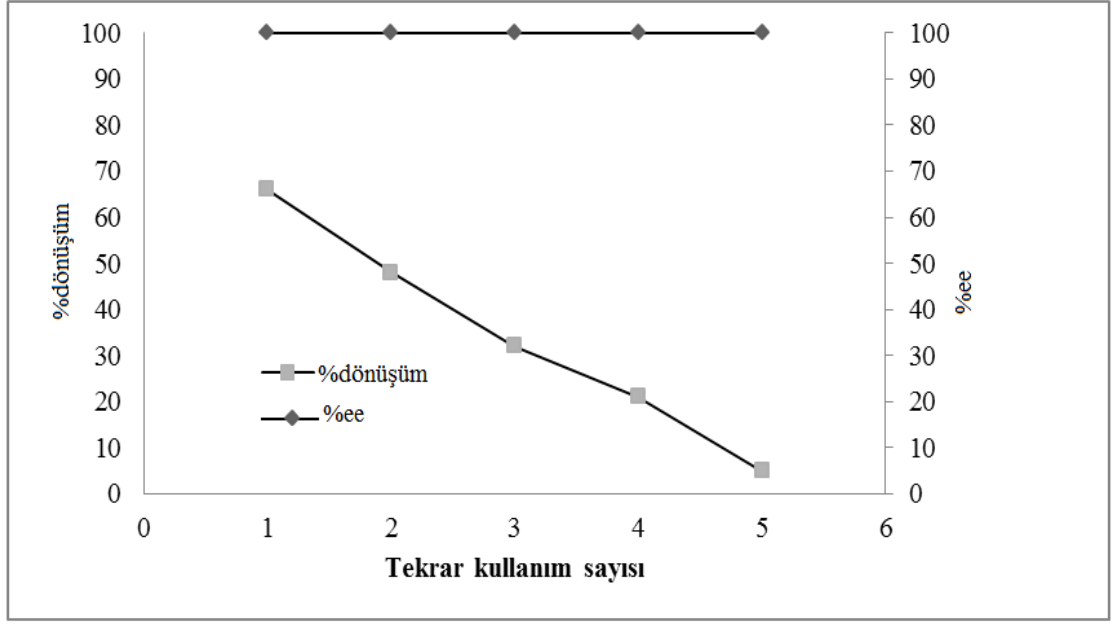


Şekil 4.24 Tutuklanmış taze havuç hücreleri için biyoindirgemeye süre etkisi
 ($C_{SO} = 2$ mM, $d_p = 2$ mm, $C_{bt} = 200$ g/L, $C_{Alj} = 2$ w/v, $V = 51$ mL, 0.1 M pH=7 fosfat tamponu, $C_{CaCl_2} = 0.05$ M, $T = 33$ °C, $N = 150$ rpm)

Aynı koşullarda 48 h sonunda serbest taze havuç ile % 92 dönüşüm elde edilmiştir.

4.4.7 Tutuklanmış biyokatalizörün yeniden kullanılabilirliği

Tutuklanmış taze havuç biyokatalizörlüğünde gerçekleştirilen biyoindirgenme deneylerinde biyokatalizörün ilk kullanımdan sonra mekanik dayanımının azaldığı ve dağıldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.25 Tutuklanmış taze havuç hücrelerinin tekrar kullanım sayısı ($C_{SO} = 2\text{mM}$, $dp = 2\text{ mm}$, $C_{bt} = 200\text{ g/L}$, $C_{Alj} = \% 2\text{ w/v}$, $V = 51\text{ mL}$, 0.1 M pH=7 fosfat tamponu, $C_{CaCl_2} = 0.05\text{M}$, $t = 48\text{ h}$, $T = 33\text{ }^\circ\text{C}$, $N = 150\text{ rpm}$)

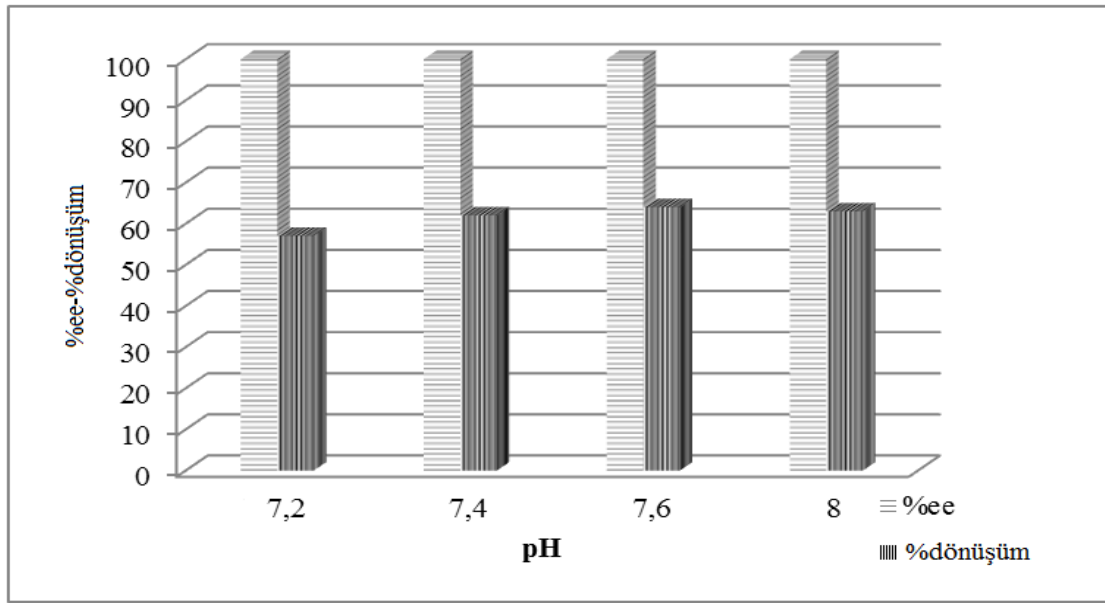
Tutuklanmış enzimlerin uygun şartlar sağlandığı zaman, serbest enzimlere göre en önemli avantajı, tekrar kullanılabilme özelliklerinin olmasıdır. Kesikli sistemde tutuklanmış taze havuç biyokatalizörlerinin tekrar kullanılabilme özelliklerinin araştırıldığı çalışmada, mekanik yapılarının, ilk kullanımdan sonra dağıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.25).

Kalsiyum alginata tutuklanmış hücreler fosfat tamponunda süspanse edilmiştir. Ancak tampon içinde bulunan sodyum ve fosfat iyonları ile kalsiyum klorür iyonları yer değiştirme tepkimesi vermiştir.



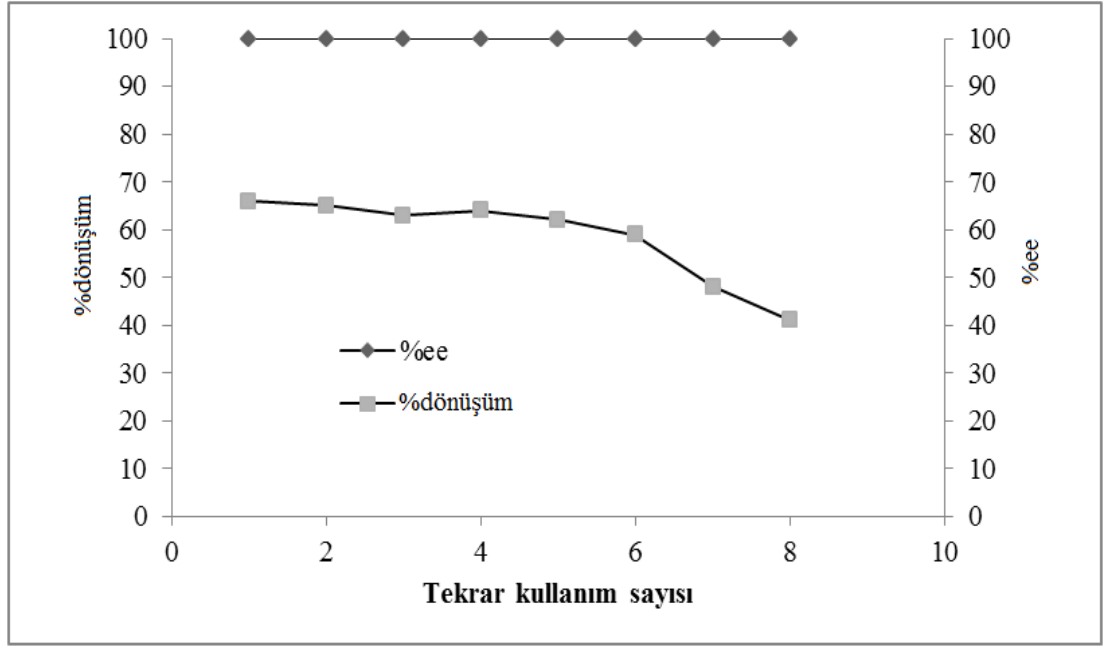
İkili yer değiştirme tepkimeleri iyonik bileşiklerin girdi olarak karşılaştıkları durumlarda birinci bileşiğin ilk pozitif iyonu ile ikinci bileşiğin ilk pozitif iyonunun yer değiştirmesi ile gerçekleşen tepkimelerdir.

şekil 4.26'da tutuklanmış taze havuç hücreleri ile kesikli sistemde, özellikle pH 7.5'in üzerinde fosfat tamponuna göre daha stabil oluşu ve kalsiyum tuzlarını ktrmemesi nedeni ile tampon ortamı olarak tris tamponu kullanılarak deneyler yapılmıştır.



şekil 4.26 Tutuklanmış taze havuç hücreleri için biyoindirgemeye pH etkisi
($C_{SO} = 2$ mM, $d_p = 2$ mm, $C_{bt} = 200$ g/L, $C_{Aij} = \% 2$ w/v, $V = 51$ mL, tris tamponu, $C_{CaCl_2} = 0.05$ M, $t = 24$ h, $T = 33$ °C, $N = 150$ rpm)

Tutuklanmış taze havuç ile biyoindirgenme deneylerinde tris tamponunda pH etkisi incelenirken, en yüksek dönüşüm % 66 ve ee % >99 değeri pH=7.6 da 24 h sonunda elde edilmiştir. Tutuklanmış taze havuç ile biyoindirgenme deneylerinde fosfat tamponunda ise aynı dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerine yaklaşık 48 h sonunda ulaşılmıştı. Bu koşullar altında tutuklanmış taze havuç hücreleri ile tekrar kullanım sayısı yeniden incelenmiştir (şekil 4.27).



Şekil 4.27 Tutuklanmış taze havuç hücrelerinin tekrar kullanım sayısı ($C_{SO} = 2$ mM, $d_p = 2$ mm, $C_{bt} = 200$ g/L, $C_{Alj} = 2$ w/v, $V = 51$ mL, $pH = 7.6$ tris tamponu, $C_{CaCl_2} = 0.05$ M, $t = 24$ h, $T = 33$ °C, $N = 150$ rpm)

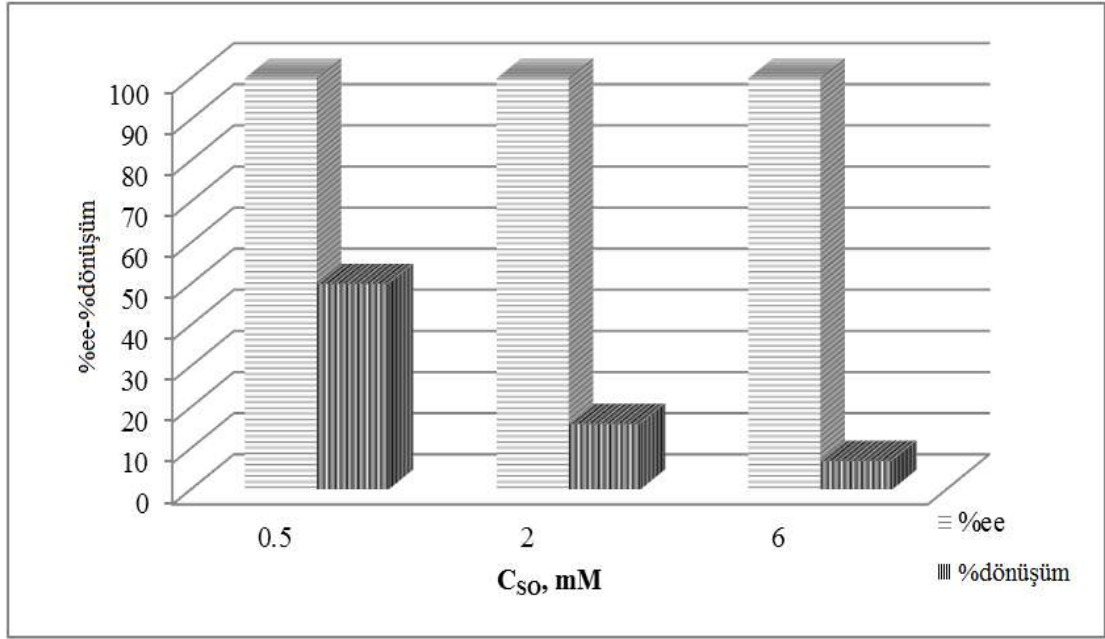
Şekil 4.27’de tutuklanmış taze havuç hücrelerinin ilk kullanımda % 66 olan dönüşüm değerinin 5 kez kullanımından sonra % 62 değerine düştüğü fakat aktivitesini yaklaşık % 90 oranında koruduğu gözlenmiştir.

4.5 Tutuklanmış Liyofilize Havuç Hücreleri ile Kesikli Sistem Deneyleri

Tutuklanmış liyofilize havuç hücreleri, Bölüm 3.3.4.3’de anlatılan yöntemle elde edilerek biyoindirgenme tepkimesi üzerine başlangıç substrat derişimi, sıcaklık etkisi, pH etkisi ve tepkime süresi etkisi incelenmiştir.

4.5.1 Başlangıç substrat derişimi etkisi

Enzim kaynağı (ADH) olarak kullanılan tutuklanmış liyofilize havuç ile yapılan deneyler sonucu 0.5 mM (0.06 g/L) substrat derişiminde (S)-enantiyomer açısından % >99 ee ve % 50 dönüşüm elde edilmiştir (Şekil 4.28).



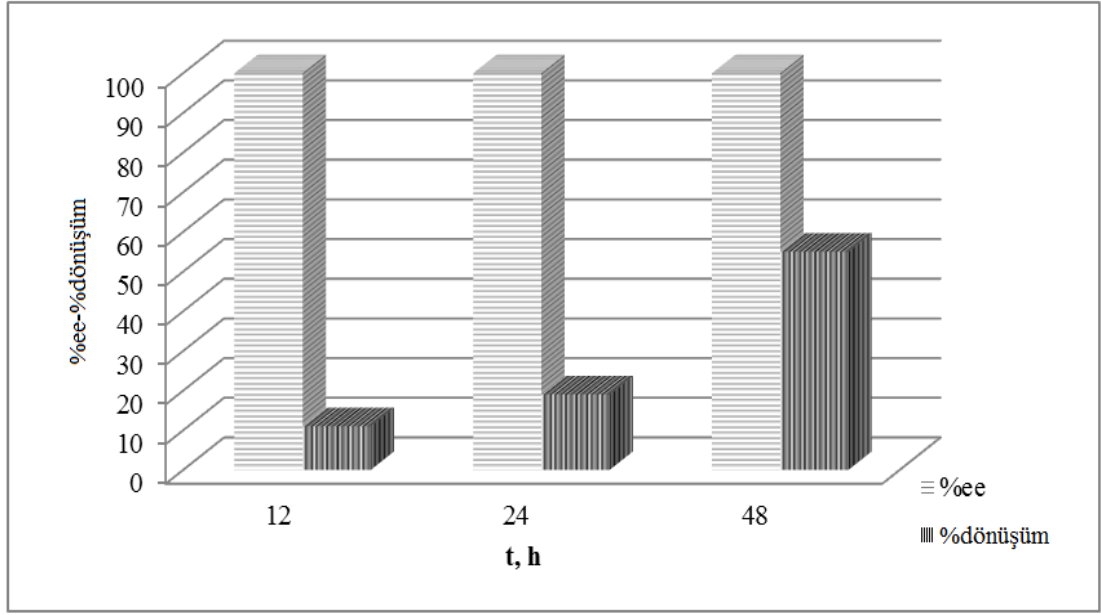
Şekil 4.28 Tutuklanmış liyofilize havuç hücreleri için biyoundirgemeye substrat derişimi etkisi ($d_p=2$ mm, $C_{bil}=200$ g/L, $C_{Alj}=\% 2$ w/v, $V=51$ mL, $pH=7$ fosfat tamponu, $C_{CaCl_2}=0.05$ M, $t=48$ h, $T=33$ °C, $N=150$ rpm)

Tutuklanmış liyofilize havuç ile elde edilen sonuçlar, serbest liyofilize havuç ile karşılaştırıldığı zaman 0.5 mM başlangıç substrat derişiminde serbest liyofilize havuç biyokatalizörlüğünde gerçekleştirilen biyoundirgenme deneylerinde % 78 dönüşüm ve % >99 ee elde edilirken, aynı koşullarda tutuklanmış liyofilize havuç ile % 50 dönüşüm ve % >99 ee elde edilmiştir.

Tutuklama işleminin getirdiği ilave kütle aktarım kısıtlamaları nedeniyle kesikli sistemde olumlu bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

4.5.2 Tepkime süresi etkisi

Tutuklanmış liyofilize havuç ile biyoundirgenme deneylerinde süre etkisi incelendiğinde, en yüksek dönüşüm % 55 ve % >99 ee olarak 48 h sonunda elde edilmiştir (Şekil 4.29).

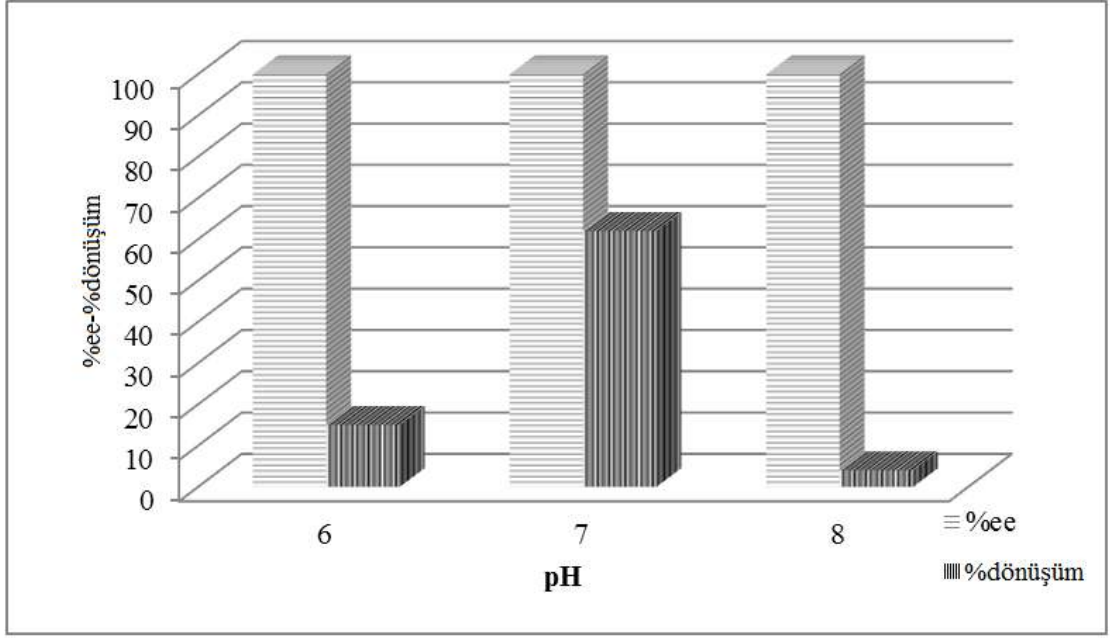


Şekil 4.29 Tutuklanmış liyofilize havuç hücreleri için biyoundirgemeye süre etkisi ($C_{SO} = 0.5$ mM, $d_p = 2$ mm, $C_{bt} = 200$ g/L, $C_{Alj} = 2$ w/v, $V = 51$ mL, pH=7 fosfat tamponu, $C_{CaCl_2} = 0.05$ M, $T = 33$ °C, $N = 150$ rpm)

Liyofilize havuç biyokatalizörü ile yapılan biyoundirgenme deneylerinde % dönüşümün zamanla arttığı gözlenmiştir.

4.5.3 pH etkisi

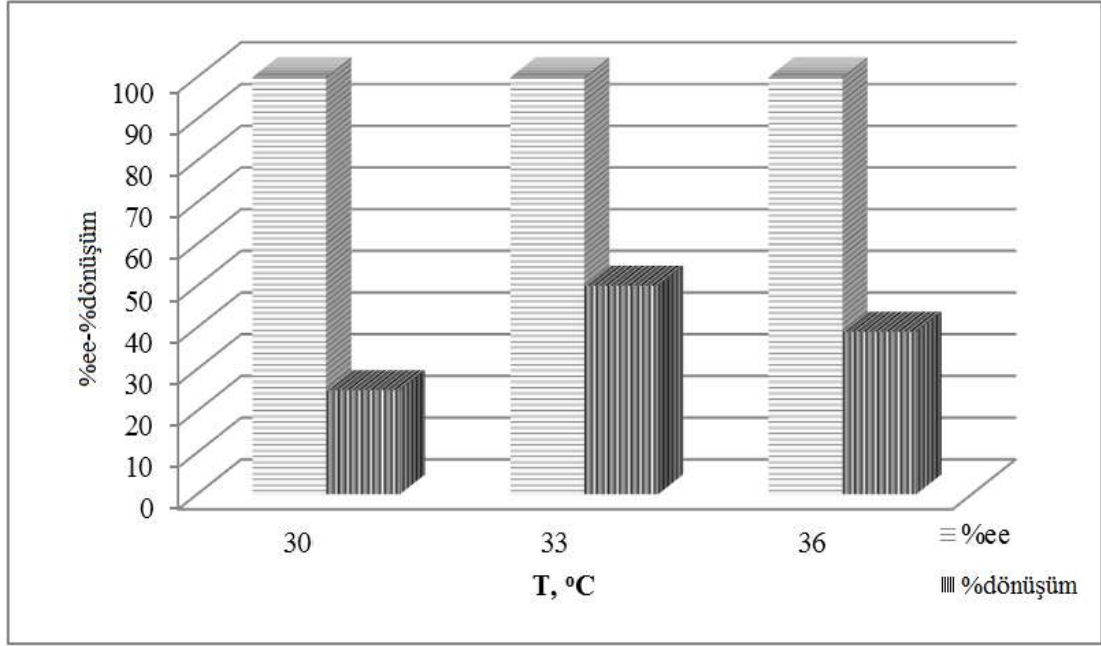
Tutuklanmış liyofilize havuç ile biyoundirgenme deneylerinde pH etkisi incelenirken, en yüksek dönüşüm % 62 ve % >99 ee değeri pH=7 de elde edilmiştir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30 Tutuklanmış liyofilize havuç hücreleri için biyoundirgemeye pH etkisi ($C_{SO} = 0.5 \text{ mM}$, $d_p = 2 \text{ mm}$, $C_{bt} = 200 \text{ g/L}$, $C_{Alj} = \% 2 \text{ w/v}$, $V = 51 \text{ mL}$, fosfat tamponu, $C_{CaCl_2} = 0.05 \text{ M}$, $t = 48 \text{ h}$, $T = 33 \text{ }^\circ\text{C}$, $N = 150 \text{ rpm}$)

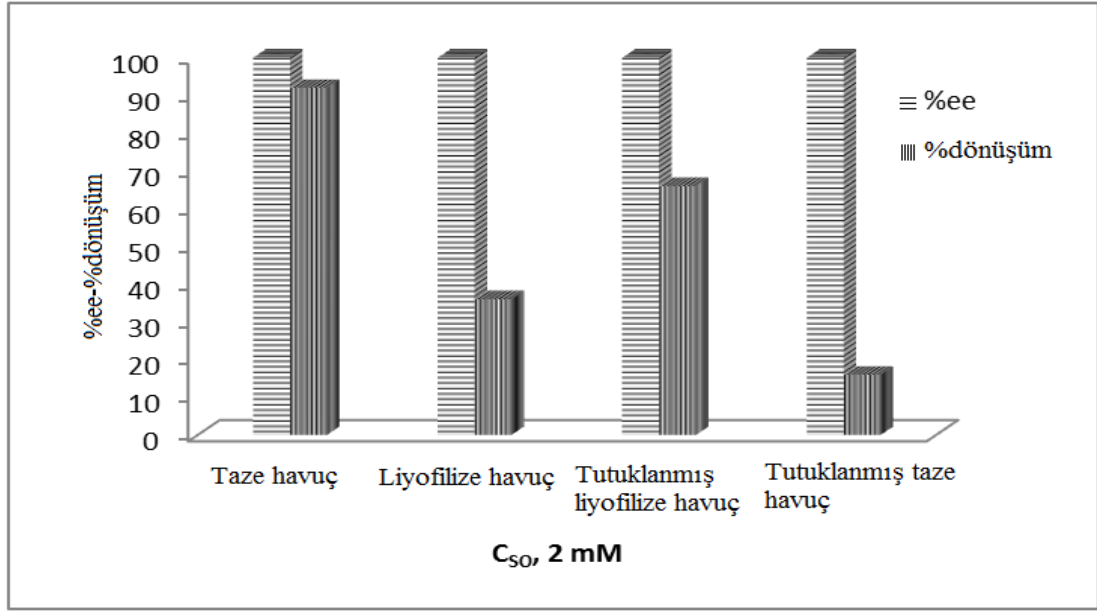
4.5.4 Sıcaklık etkisi

Tutuklanmış liyofilize havuç ile biyoundirgenme deneylerinde sıcaklık etkisi incelenirken, en yüksek dönüşüm % 50 ve % >99 ee değeri $33 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de elde edilmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31 Tutuklanmış liyofilize havuç hücreleri için biyoundirgemeye sıcaklık etkisi ($C_{SO} = 0.5$ mM, $d_p = 2$ mm, $C_{bi} = 200$ g/L, $C_{Alj} = \% 2$ w/v, $V = 51$ mL, fosfat tamponu, $C_{CaCl_2} = 0.05$ M, $t = 48$ h, $N = 150$ rpm)

Liyofilize havuç ile yapılan deneyler sonucunda rehidrasyonun tam olarak gerçekleşmemesi nedeniyle azalan aktivite ile tutuklama işleminden kaynaklanan difüzyon kısıtlamaları arzu edilen dönüşüm değerlerine ulaşmayı engellemiştir. Şekil 4.31'den de görüldüğü gibi, tutuklanmış liyofilize havuç ile % 16 dönüşüm elde edilmiştir.



Şekil 4.32 Taze havuç, liyofilize havuç, tutuklanmış taze ve tutuklanmış liyofilize havuç için %ee-%dönüşüm

4.6 Kesikli Sistemde Liyofilize Hücrelerle Biyoindirgemenin Cevap Yüzey Yöntemiyle (RSM) Optimizasyonu

Bağımsız değişkenler; substrat derişimi, hücre derişimi, karıştırma hızı ve tepkime süresi, cevap değişkeni ise ürün olarak elde edilen (S)-1-feniletanol derişimi olarak belirlenmiştir. Substrat derişimi aralığı belirlenirken substrat inhibisyonu dikkate alınarak, inhibisyonun olmadığı aralıkta deneyler yapılmıştır.

Deneysel verilere uygun fonksiyonun bulunmasından sonra modelin geçerliliğini kontrol etmek için kullanılan en güvenilir yol varyans analizi (ANOVA)'dır (Vieira ve Hoffman, 1989).

Yapılan bu deneyler sonucunda program tarafından elde edilen proses değişkenlerinin yanıtı tahminlenmiş (Çizelge 4.1) ve quadratik model eşitliği (ikinci derece polinom denklem) gerçek değerler için aşağıda verilmiştir (Eşitlik 4.4).

Çizelge 4.1 Bağımsız değişkenler için deney matrisi ve tahminlenen cevap değerleri

Deney	A:Cbl	B:karıştırma hızı	C:t	D:C _{So}	C _{S-1FE}
	g/L	rpm	h	mM	mM
1	10.00	100.00	96.00	2.00	0.109
2	30.00	150.00	100.20	1.05	0.57
3	30.00	205.00	54.00	1.05	0.57
4	10.00	200.00	96.00	2.00	0.109
5	30.00	150.00	54.00	1.05	0.57
6	30.00	150.00	54.00	1.05	0.57
7	10.00	100.00	96.00	0.10	0.08
8	50.00	100.00	96.00	2.00	0.108
9	50.00	200.00	12.00	0.10	0.077
10	50.00	100.00	12.00	2.00	0.038
11	10.00	200.00	96.00	0.10	0.08
12	30.00	150.00	54.00	1.05	0.57
13	10.00	200.00	12.00	2.00	0.037
14	50.00	100.00	96.00	0.10	0.08
15	52.00	150.00	54.00	1.05	0.5
16	50.00	200.00	12.00	2.00	0.0371
17	10.00	200.00	12.00	0.10	0.077
18	50.00	100.00	12.00	0.10	0.076
19	30.00	150.00	54.00	1.05	0.57
20	8.00	150.00	54.00	1.05	0.41
21	50.00	200.00	96.00	2.00	0.1091
22	10.00	100.00	12.00	0.10	0.077
23	30.00	150.00	54.00	2.09	0.146
24	50.00	200.00	96.00	0.10	0.08
25	30.00	150.00	7.80	1.05	0.15
26	30.00	150.00	54.00	0.01	0.007
27	30.00	150.00	54.00	1.05	0.57
28	10.00	100.00	12.00	2.00	0.037
29	30.00	150.00	54.00	1.05	0.57
30	30.00	95.00	54.00	1.05	0.56

$$\begin{aligned}
 C_{(S)-1\text{-feniletanol}} = & 0.20710 + 6.55477 \cdot 10^{-3} \cdot Ch - 5.85893 \cdot 10^{-3} \cdot \text{rpm} + 7.9105 \cdot 10^{-3} \cdot t \\
 & + 0.80883 \cdot C_{So} + 7.50000 \cdot 10^{-3} \cdot C_{bl} \cdot \text{rpm} - 7.44048 \cdot 10^{-8} \cdot C_{bl} \cdot t + 3.94737 \cdot 10^{-6} \cdot C_{bl} \cdot C_{So} \\
 & + 2.97619 \cdot 10^{-8} \cdot \text{rpm} \cdot t - 1.05263 \cdot 10^{-6} \cdot \text{rpm} \cdot C_{So} + 4.27632 \cdot 10^{-4} \cdot t \cdot C_{So} - 1.04993 \cdot 10^{-4} \cdot C_{bl}^2 \\
 & + 1.95647 \cdot 10^{-5} \cdot \text{rpm}^2 - 6.83161 \cdot 10^{-5} \cdot t^2 - 0.39314 \cdot C_{So}^2
 \end{aligned} \quad (4.4)$$

Oluşturulan bu modelin deneysel verileri ne ölçüde karşıladığı varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Bu yöntemle her bir faktörün lineer, quadratik ve interaksiyon etkilerinin cevaplar üzerindeki istatistiksel önemlilikleri % 95 güvenlik seviyesinde Fischer (F testi) uygulanarak program tarafından bulunmuştur. Sonuçlara

göre önerilen modelde $p (< 0.0001) < 0.05$ olduğu görülmektedir. Bu da önerilen model eşitliğinin istatistiksel olarak yaklaşık % 99.99 güven aralığında önemli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2 Merkez Tümlleşik Tasarım (CCD) için ANOVA testi

	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin Oranı	F Değeri	p-değeri Prob > F
Model	1.48	14	0.11	19.05	< 0.0001
A-C _{bl}	5.235. 10 ⁻⁴	1	5.235. 10 ⁻⁴	0.094	0.7628
B-rpm	8.080. 10 ⁻⁶	1	8.080. 10 ⁻⁶	1.458. 10 ⁻³	0.9700
C-t	0.031	1	0.031	5.67	0.0309
D-C _{S0}	2.372. 10 ⁻⁴	1	2.372. 10 ⁻⁴	0.043	0.8389
AB	9.000. 10 ⁻⁸	1	9.000. 10 ⁻⁸	1.624. 10 ⁻⁵	0.9968
AC	6.250. 10 ⁻⁸	1	6.250. 10 ⁻⁸	1.128. 10 ⁻⁵	0.9974
AD	9.000. 10 ⁻⁸	1	9.000. 10 ⁻⁸	1.624. 10 ⁻⁵	0.9968
BC	6.250. 10 ⁻⁸	1	6.250. 10 ⁻⁸	1.128. 10 ⁻⁵	0.9974
BD	4.000. 10 ⁻⁸	1	4.000. 10 ⁻⁸	7.216. 10 ⁻⁶	0.9979
CD	4.658. 10 ⁻³	1	4.658. 10 ⁻³	0.84	0.3738
A ²	8.149. 10 ⁻³	1	8.149. 10 ⁻³	1.47	0.2441
B ²	7.301. 10 ⁻³	1	7.301. 10 ⁻³	1.32	0.2691
C ²	0.059	1	0.059	10.57	0.0054
D ²	0.44	1	0.44	79.29	< 0.0001
Residual	0.083	15	5.543. 10 ⁻³		
Lack of Fit	0.083	10	8.314. 10 ⁻³		
Hata	0.000	5	0.000		
Toplam	1.56	29			

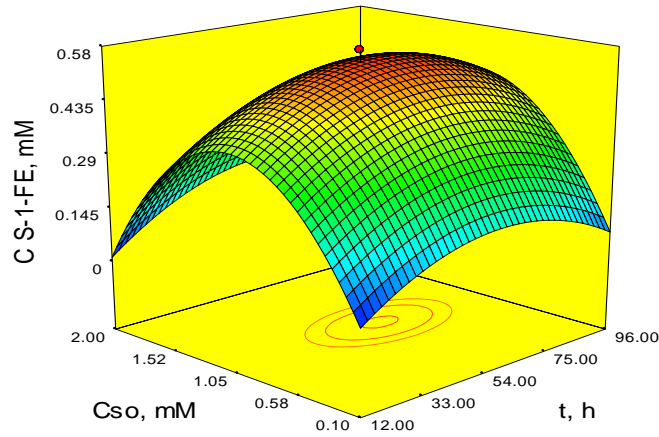
R²=0.95, Adeq Precision=10.709

Çizelge 4.2’de de görüldüğü gibi, model ile elde edilen değerler arasındaki uyum eksikliği 0.083 belirlenmiştir. Bu durumda modelin uyum eksikliği önemsizdir. Model için, Prob > F değerinin (< 0.0001) 0.05’den küçük olması modelin sistemi iyi temsil ettiğini göstermektedir. Her bir parametrenin bireysel olarak ürün derişimine olan etkisi incelendiğinde, reaksiyon süresinin ürün derişimine pozitif doğrusal bir etkide bulunduğunu ve bu etkinin p değeri yaklaşık 0.03 yani yaklaşık % 97 güven aralığında önemli olduğu görülmektedir. Karıştırma hızının negatif, biyokatalizör derişiminin pozitif ve başlangıç substrat derişiminin ise pozitif işaretle yaklaşık % 1-3 güven aralığında çok fazla etkiye sahip olmadığı ANOVA tablosunda p değerlerine bakıldığında görülmektedir. Bu durum artan bağımsız değişken miktarlarında bir noktaya kadar ürün derişiminin artacağı fakat belirli bir seviyeyi aştıktan sonra olumsuz yönde etkilendiğinin bir göstergesidir.

Bağımsız değişkenlerin interaksiyon etkileri incelendiğinde, her bir bağımsız değişken ile ürün derişimi arasındaki interaksiyonun P değeri 0.05'den büyük olduğu için interaksiyon etkilerinin (CD hariç p değeri 0.3738) önemsiz olduğu görülmektedir. Bağımsız değişkenlerin interaksiyon etkilerinde görülen eksi değerli regresyon katsayıları da bu interaksiyon etkilerinin belirli bir seviyeye kadar ürün derişimini arttırıcı yönde olacaklarının, fakat bu nokta aşıldığında olumsuz yönde etkilemeye başlayacaklarının bir göstergesidir.

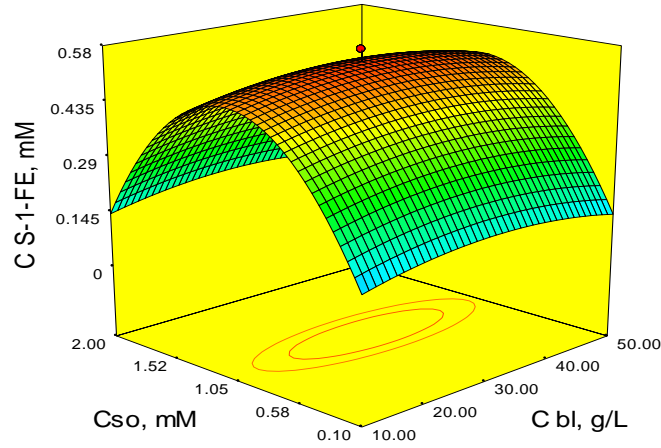
Bağımsız değişkenlerin quadratik etkileri incelendiğinde ise, reaksiyon süresi ve başlangıç substrat derişiminin ürün derişimine etkilerinin diğerlerine göre önemli olduğu görülmektedir (yaklaşık sırayla % 99.5 ve 99.99 güven aralığında). Bu etkilerin p değerleri sırası ile 0.0054 ve <0.0001 dir.

İncelenen 4 bağımsız değişken faktörlerinden biri merkezde sabit tutulup diğer iki faktör seviyelerinin ürün derişimi üzerine olan etkileri Şekil 4.33-4.37'de görülen cevap yüzey grafikleri ile elde edilmektedir.



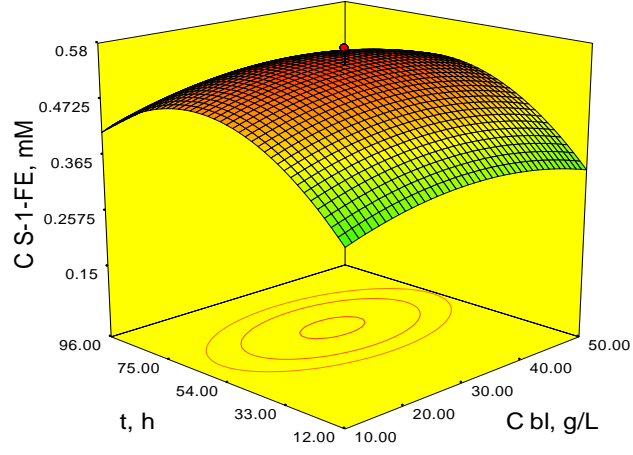
Şekil 4.33 (S)-1-feniletanol derişimine, substrat derişimi ve tepkime süresi etkisinin üç boyutlu grafiği (T=33 °C, pH=7)

Şekil 4.33'den de görüldüğü gibi, substrat derişiminin artması ürün derişimini arttırmış fakat tepkime ilerledikçe tekrar azalmıştır. Yapılan RSM deneyleri ile 72 h sonrasında ürün derişiminde az da olsa bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu durum tepkime ortamında belli bir süre sonra yan ürünlerin oluşmuş olabileceği ile açıklanmıştır.

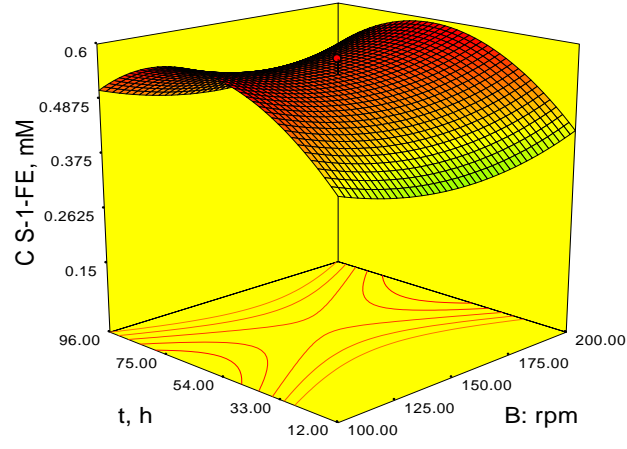


Şekil 4.34 (S)-1-feniletanol derişimine, biyokatalizör derişimi ve substrat derişimi etkisinin üç boyutlu grafiği (T=33 °C, pH=7)

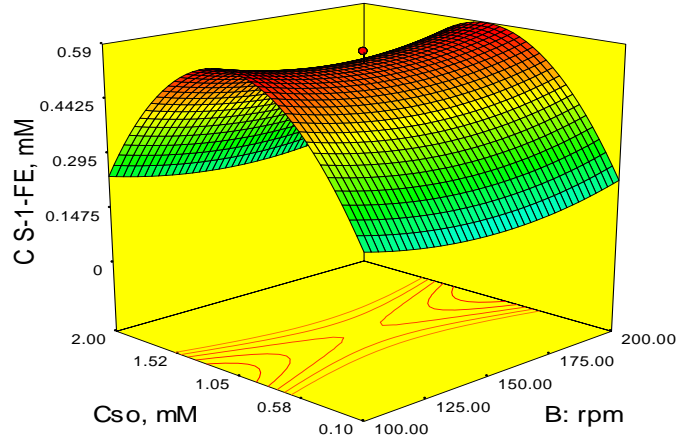
Biyokatalizör derişiminin artmasının ürün derişimi üzerine çok fazla etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.35 (S)-1-feniletanol derişimine, biyokatalizör derişimi ve tepkime süresi etkisinin üç boyutlu grafiği ($T=33\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7$)



Şekil 4.36 (S)-1-feniletanol derişimine, tepkime süresi ve karıştırma hızı etkisinin üç boyutlu grafiği ($T=33\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7$)



Şekil 4.37 (S)-1-feniletanol derişimine, substrat derişimi ve karıştırma hızı etkisinin üç boyutlu grafiğı (T=33 °C, pH=7)

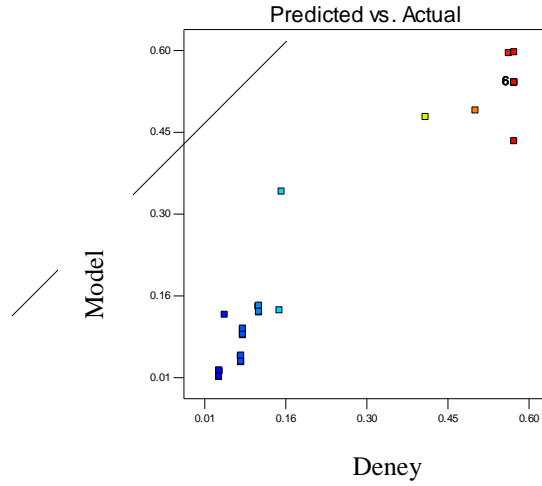
Şekil 4.33-4.37’de görüldüğü gibi, karıştırma hızı ve biyokatalizör derişiminin ürün derişimi üzerine çok fazla bir etkisi gözlenmezken, substrat derişimi ve reaksiyon süresinin etkili olduğu gözlenmiştir.

Elde edilen bu ikinci dereceden model denkleminin çözümü yapılarak, ürün derişiminin en yüksek olacağı optimum koşullar belirlenmiştir. Denklemin çözümü için Design Expert paket programı kullanılmıştır. Bu optimum koşullar kullanılarak çözülen model denklemin sonucu ürün derişiminin en yüksek olduğu 0.578 mM değerini vermektedir. Design Expert ile elde edilen optimum koşullar çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Model denklemin çözümü sonucunda elde edilen optimum koşullar

Faktörler	Optimum koşullar
Başlangıç substrat derişimi (mM)	0.96
Karıştırma hızı (rpm)	199.82
Reaksiyon süresi (h)	51.68
Biyokatalizör derişim (g/L)	24.95

Bu optimum noktalarda tekrarlanan deney sonucunda 0.6 mM ürün elde edilmiş ve elde edilen değer model eşitliği tarafından hesaplanan 0.578 mM değeri ile uygunluk göstermiştir. Şekil 4.38, model tarafından teorik olarak hesaplanan değerlere karşı gözlenen (deneysel) değerlerin ilişkisini göstermektedir. Deneysel verilerle modelden hesaplanan değerlerin uyumlu olduğu görülmektedir ($R^2=0,95$).

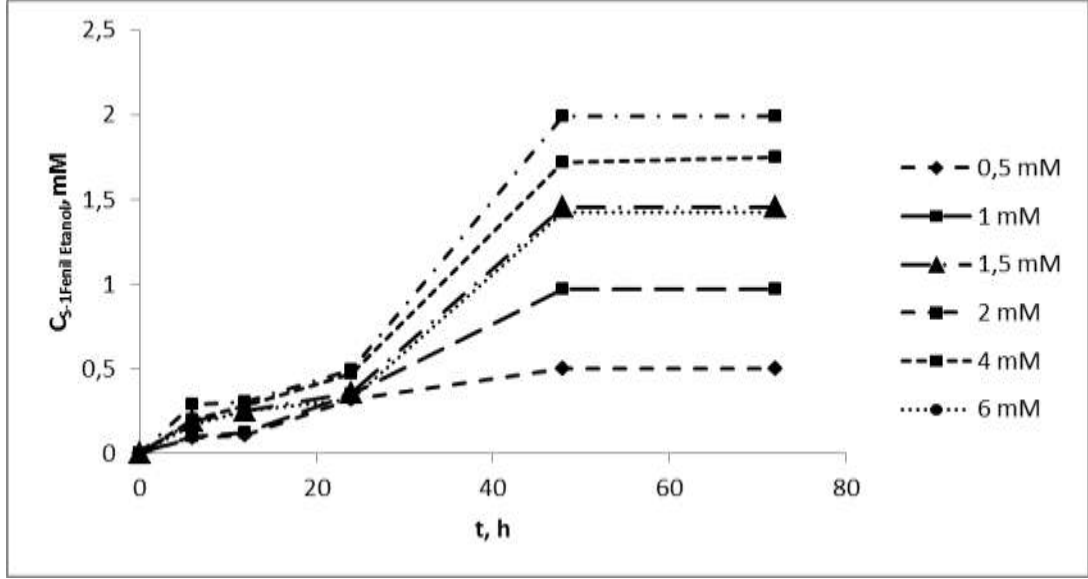


Şekil 4.38 Deney sonuçları ve model arasındaki ilişki

4.7 Kinetik Çalışmaları

4.7.1 Serbest taze havuç biyokatalizörlüğünde enzim kinetiği çalışmaları

D. carota (havuç) biyokatalizörlüğünde enzim kinetiği çalışmalarında, 0.5 – 6 mM (0.06-0.72 g/L) başlangıç derişimlerinde kesikli sistemde yapılan deneylerde C_{S-1} -feniletanol derişiminin zamanla değişimi incelenmiştir.

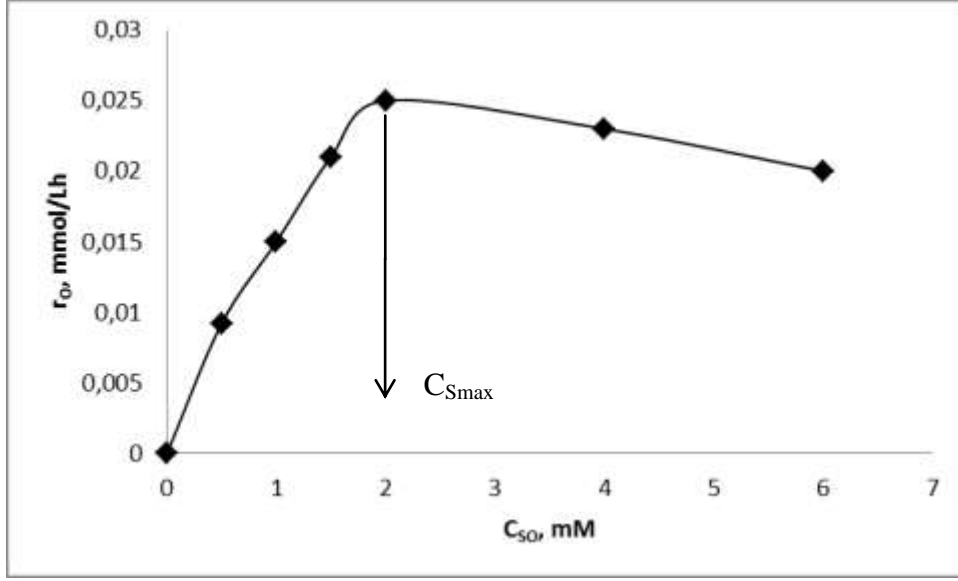


Şekil 4.39 Substrat derişimi ile (S)-1-feniletanol derişiminin değişimi ($C_b=200$ g/L, $N=150$ rpm, $T=33$ °C, $pH=7$)

Çizelge 4.4 Başlangıç tepkime hızının, başlangıç substrat derişimi ile değişimi

C_{S_0} , mM	r_0 , mmol/Lh	$r_0 \times 10^{-5}$, $g_{\text{substrat}}/g_{\text{biyokatalizör}} \cdot h$
0.5	0.0092	0.5566
1	0.015	0.9075
1.5	0.021	1.27
2	0.025	1.52
4	0.023	1.39
6	0.02	1.21

Başlangıç substrat derişimine karşı başlangıç tepkime hızları grafiğe geçirildiğinde substrat inhibisyonu olduğu görölmüştür (Şekil 4.40).



Şekil 4.40 Başlangıç substrat derişimine karşı başlangıç tepkime hızı grafiği
(C_b=200 g/L, N=150 rpm, T=33 °C, pH=7)

Şekil 4.40'dan da görüldüğü gibi, 2 mM üzerinde substrat inhibisyonu olduğu görülmüştür. Substrat inhibisyon modeli;

$$r = \frac{r_{maks} C_S}{K_M + C_S + \frac{C_S^2}{K_{SS}}} \quad (4.5)$$

4.7.1.1 Lineweaver-Burk ile doğrusallaştırma

Lineweaver-Burk grafiği Eşitlik 4.5'in ters çevrilmesi sonucu elde edilir. Eşitlik 4.5 Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak doğrusallaştırılırsa;

$$\frac{1}{r} = \frac{K_M + C_S + \frac{C_S^2}{K_{SS}}}{r_{maks} C_S} = \frac{K_M}{r_{maks}} \frac{1}{C_S} + \frac{1}{r_{maks}} + \frac{C_S}{r_{maks} K_{SS}} \quad (4.6)$$

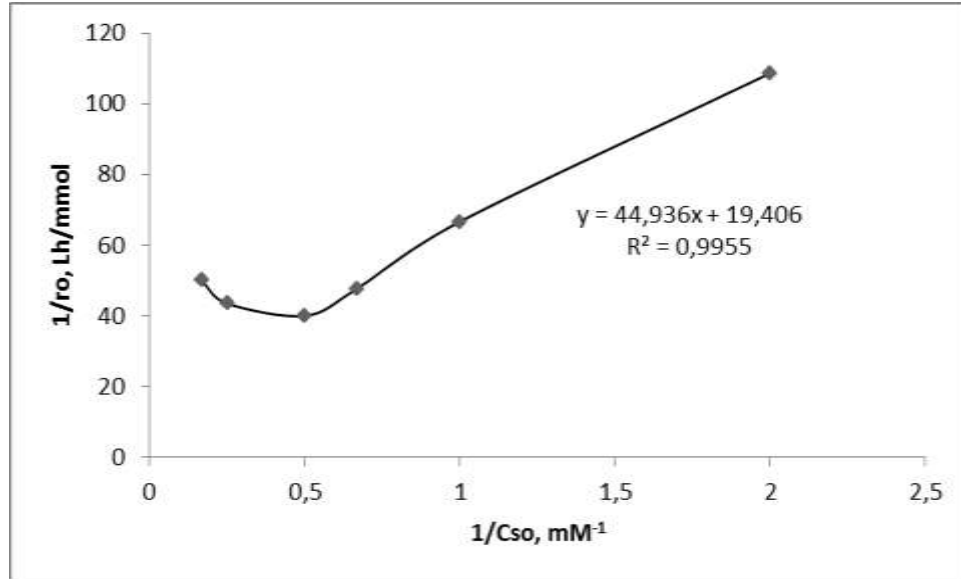
$$\frac{1}{r} = \frac{K_M}{r_{maks}} \frac{1}{C_S} + \frac{1}{r_{maks}} \left(1 + \frac{C_S}{K_{SS}}\right) \quad (4.7)$$

Düşük substrat derişimlerinde $\frac{C_S}{K_{SS}} \ll 1$ olduğundan, Eşitlik 4.7 düzenlenir;

$$\frac{1}{r} = \frac{K_M}{r_{maks}} \frac{1}{C_S} + \frac{1}{r_{maks}} \quad (4.8)$$

Çizelge 4.5 Başlangıç tepkime hızı- başlangıç substrat derişimi değişimi

C_{S0} , mM	r_0 , mmol/Lh	$1/C_{S0}$, mM ⁻¹	$1/r_0$, Lh / mmol
0,5	0.0092	2	108.69
1	0.015	1	66.670
1,5	0.021	0.66	47.620
2	0.025	0.5	40.000
4	0.023	0.25	43.480
6	0.02	0.16	50.000



Şekil 4.41 $1/C_{S0}$ - $1/r_0$ grafiği ($d_p = 1.52$ mm, $C_b = 200$ g/L, $N = 150$ rpm, $T = 33$ °C, $pH = 7$)

Eşitlik 4.18 ve Şekil 4.41'den yararlanarak, 0.5-2 mM derişim aralığındaki doğrunun eğimi K_M / r_{maks} 'ı, kayması ise $1 / r_{maks}$ 'ı verir.

$$K_{ayma} = 1/r_{maks} = 19.406 ; r_{maks} = 0.0515 \text{ mmol/Lh} \quad (4.9)$$

$$Eğim = K_M / r_{maks} = 44.936; K_M = 0.0515 * 44.936 = 2.31 \text{ mmol/L} \quad (4.10)$$

Eşitlik 4.5'in türevi alınır;

$$\frac{dr}{dC_S} = 0 = C_{Smaks} = \sqrt{K_M K_{SS}} \quad (4.11)$$

$2 = \sqrt{2.31 K_{SS}}$ ise $K_{SS} = 1.73 \text{ L/mmol}$ olarak elde edilir.

Kinetik sabitler, substrat inhibisyon modelinde (Eşitlik 4.5) yerine yazılır;

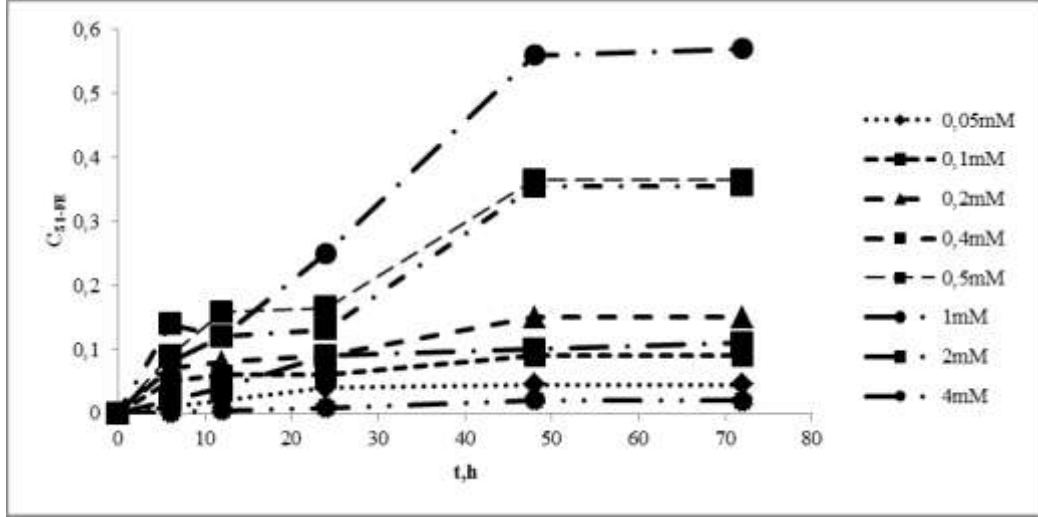
$$r = \frac{0.0515 C_S}{2.31 + C_S + \frac{C_S^2}{1.73}} \quad (4.12)$$

Michaelis-Menten denkleminde göre; K_M (Michaelis-Menten sabiti), enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermektedir. K_M değeri küçük olan enzim, substratı için yüksek bir affinite gösterir; enzim düşük bir substrat derişiminde doyararak maksimal hız sağlar. K_M değeri büyük olan enzim, substratı için düşük bir affinite gösterir; enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat derişimi gerekmektedir. Bir enzim için K_M değeri, enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimini karakterize eden bir sabit sayıdır.

K_M değeri, 3-10 mM ve daha düşük olan enzimler yüksek afiniteli enzimlerdir. Burada $K_M = 2.31 \text{ mM}$ bulunmuştur. ADH enzimi kaynağı olarak seçilen *D. Carota* (taze havuç), asetofenona ilgisi K_M değeri gözönüne alındığında yüksek olduğu görülmektedir.

4.7.2 Liyofilize havuç biyokatalizörlüğünde enzim kinetiği çalışmaları

Liyofilize D. carota (liyofilize havuç) biyokatalizörlüğünde gerçekleşen enzim kinetiği çalışlarında, 0.5 – 6 mM (0.06-0.72 g/L) derişimlerine karşı $C_{(S)-1\text{-feniletanol}}$ değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.42)



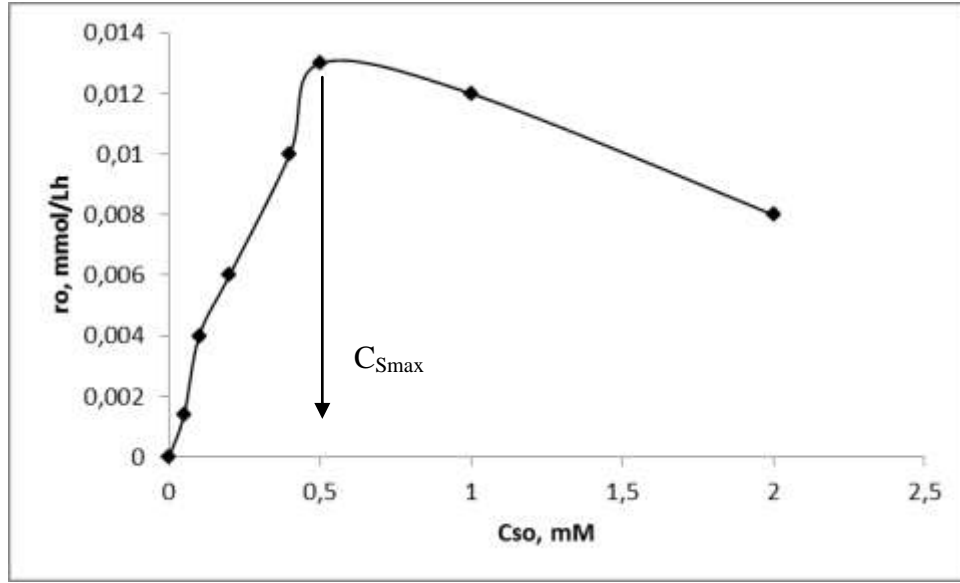
Şekil 4.42 Substrat derişimi ile (S)-1-feniletanol derişiminin değişimi ($C_{b1}=30$ g/L, $N=150$ rpm, $T=33$ °C, $pH=7$)

Çizelge 4.6 Liyofilize havuç ile başlangıç tepkime hızı- başlangıç substrat derişimi değişimi

C_{So} , mM	r_o , mmol/Lh	$r_o \times 10^{-6}$, $g_{substrat}/g_{biyokatalizör} h$
0.05	0.0014	0.847
0.1	0.0050	3.025
0.2	0.0060	3.630
0.4	0.0100	6.050
0.5	0.0130	7.865
1	0.0092	5.560
2	0.0080	4.840

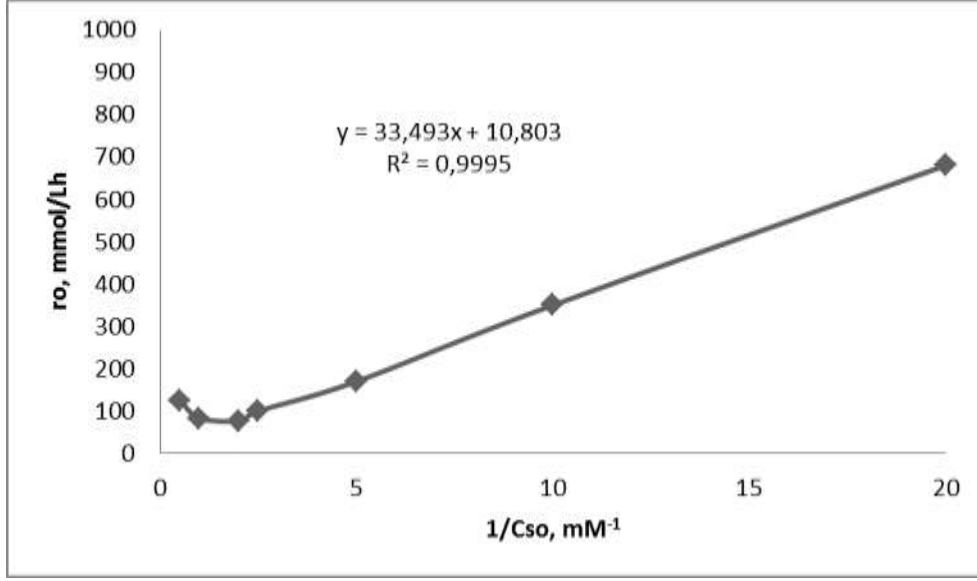
Çizelge 4.7 Lineweaver-Burk için liyofilize havuç ile başlangıç tepkime hızı- başlangıç substrat derişimi değişimi

C_{S_0} , mM	r_0 , mmol/Lh	$1/ C_{S_0}$, mM ⁻¹	$1/ r_0$, Lh / mmol
0.05	0.0014	20	1000
0.1	0.005	10	500
0.2	0.006	5	257
0.4	0.01	2.5	167
0.5	0.013	2	125
1	0.0092	1	111
2	0.008	0.5	400



şekil 4.43 Liyofilize havuç için başlangıç substrat derişimine karşı başlangıç tepkime hızı grafiği ($C_{bi}=30$ g/L, $N=150$ rpm, $T=33$ °C, $pH=7$)

şekil 4.43'den de görüldüğü gibi, 0.5 mM üzerinde substrat inhibisyonu olduğu grlmştr.



Şekil 4.44 Liyofilize havuç için Lineweaver-Burk ile $1/C_{so}$ - $1/r_o$ grafiği ($C_{bl}=30$ g/L, $N=150$ rpm, $T=33$ °C, $pH=7$)

$$\text{Eğim} = K_M / r_{\max} = 33.493; K_M = 3.10 \text{ mmol/L} \quad (4.13)$$

$$\text{Kayma} = 1 / r_{\max} = 10.803; r_{\max} = 0.092 \text{ mmol/Lh} \quad (4.14)$$

$$K_{SS} = 0.08 \text{ L/mmol}$$

$$r = \frac{0.092 C_S}{3.10 + C_S + \frac{C_S^2}{0.08}} \quad (4.16)$$

Çizelge 4.8 Taze ve liyofilize havuç için K_M ve r_{\max} değerleri

	K_M (mmol/L)	r_{\max} (mmol/Lh)
Taze havuç	2.31	0.052
Liyofilize havuç	3.10	0.092

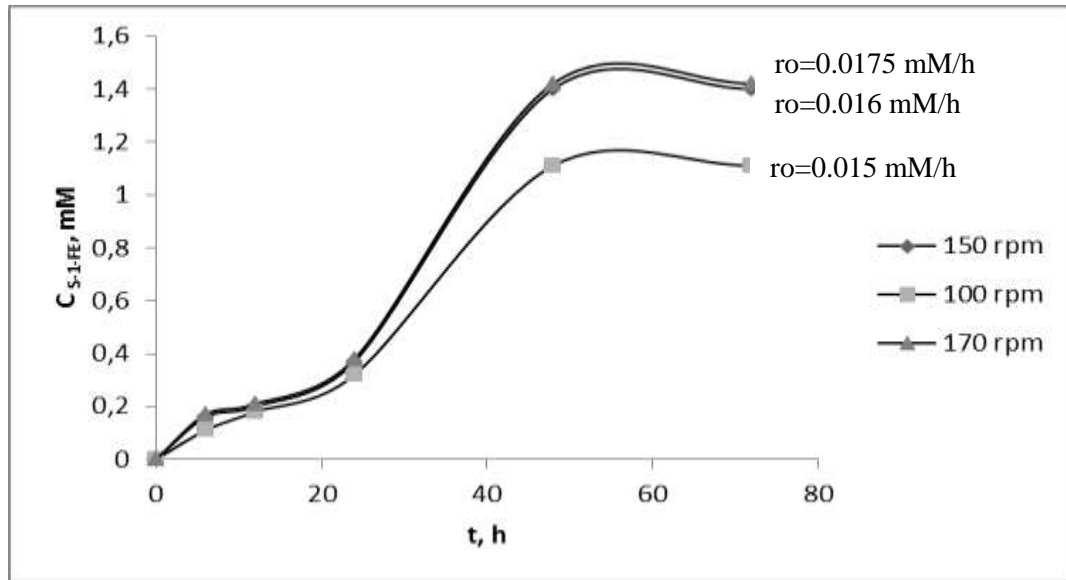
Liyofilize havuç biyokatalizörü için enzimin substratına karşı olan ilgisini belirten K_M (3.10) değeri, taze havuç biyokatalizörüne (2.31) göre yüksek bir değere sahiptir. Liyofilizasyon işlemi enzimin affinitesini olumsuz etkilemiştir.

4.7.3 Tutuklanmış hücrelerde iç ve dış kütle aktarım dirençleri

Tutuklanmış enzimler, serbest çözünen enzimlerde olmayan yeni bir probleme neden olabilir. Bu problemler, büyük partikül büyüklüğündeki enzimlerden kaynaklanan kütle aktarım dirençleridir. Tutuklanmış enzim, partikül yüzeyine tutuklanmış ve sadece sıvı yığınının reaksiyonun gerçekleştiği partikül yüzeyine kütle aktarımı söz konusu ise dış kütle aktarımı gerçekleşir.

Enzimler polimerizasyon veya mikroenkapsülasyon ile immobilize ediliyorsa, partikül içi kütle aktarım dirençleri, enzimatik reaksiyonun hızını etkileyebilir. Partikül içi kütle aktarım dirençleri analizi, substratın aljinat, agaroz, agar veya jelatin gibi tutuklama matrislerindeki etkin difüzyonunun bilinmesini gerektirir.

Dış yayılım dirençleri, tutuklama matrisi etrafındaki hidrodinamik koşullar ile ortadan kaldırılabılır. Bu amaçla, karıştırma hızları, 2 mm çaplı tutuklanmış taze havuç için, 2mM başlangıç substrat derişiminde 100, 150 ve 170 rpm aralığında farklı sürelerde incelenmiştir.



Şekil 4.45 Karıştırma hızının başlangıç tepkime hızına etkisi ($d_p=2$ mm, $C_{S_0}=2$ mM, $C_{CaCl_2}=0.05$ M, $T=33$ °C, pH 7.6 tris tamponu, $N=170$ rpm)

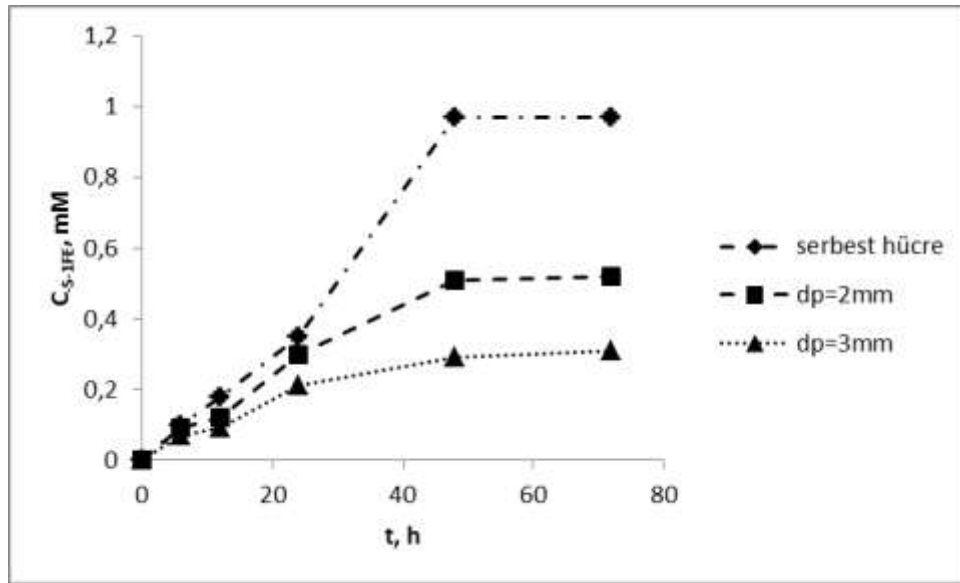
Yüksek karıştırma hızında çalışılarak, partikül yüzeyinde oluşabilecek film dirençleri kırılmıştır. Böylece dış kütle aktarım dirençleri ihmal edilmiştir.

Reaksiyon hızının, kütle aktarım dirençleri ile azalma derecesini ölçmek için tutuklanmış sistemlerde bir etkinlik faktörü tanımlanmıştır,

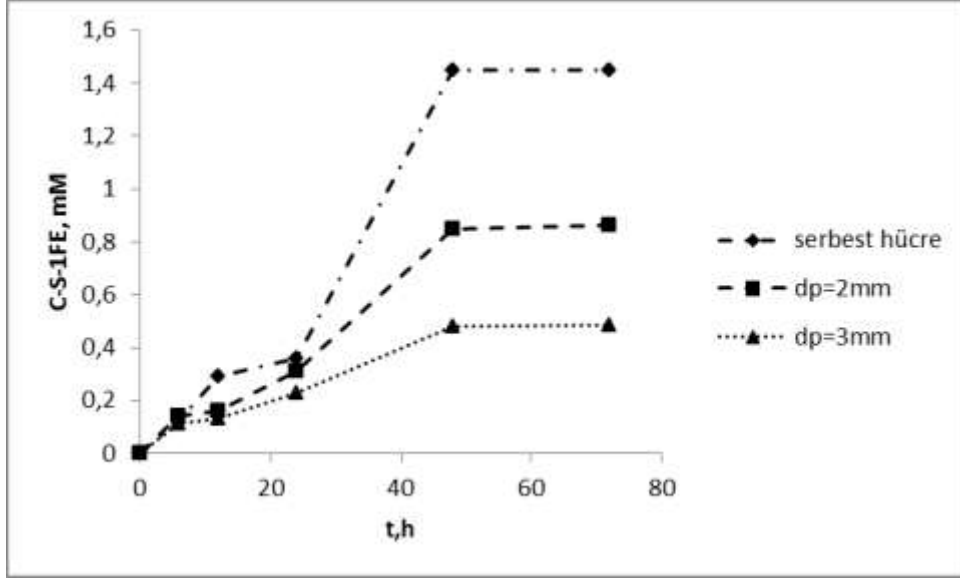
$$\eta = \frac{r_{göz}}{r_{gerçek}} \quad (4.17)$$

Tutuklanmış hücre ile elde edilen tepkime hızı difüzyon kısıtlanmalı tepkime hızı yani gözlenen hız, serbest hücre ile elde edilen tepkime hızı ise dirençlerin olmadığı durumdaki yani gerçek tepkime hızıdır.

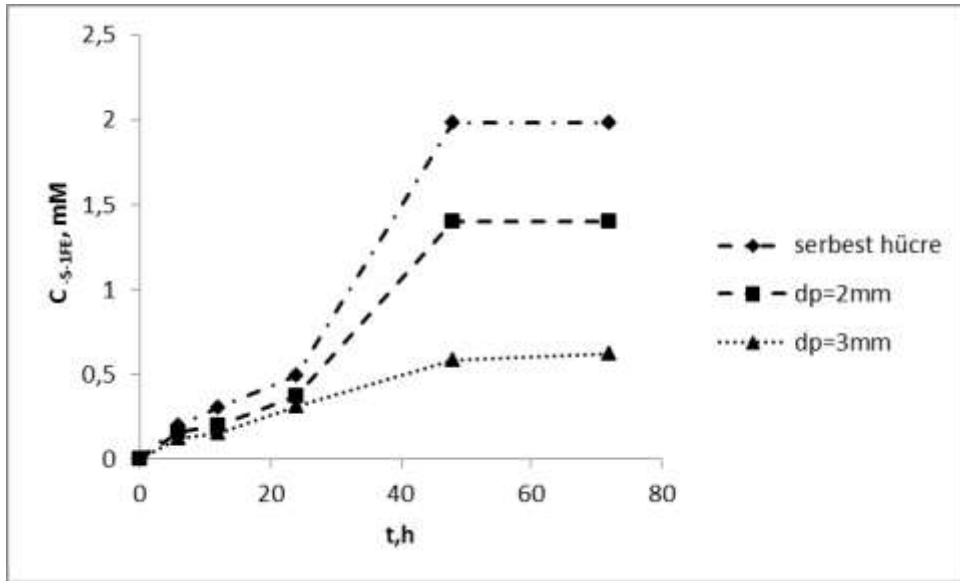
1, 1.5, 2 ve 4 mM başlangıç substrat derişimlerinde farklı çaplara sahip (2 ve 3 mm) tutuklanmış taze havuç hücreleri ile deneyler gerçekleştirilmiştir.



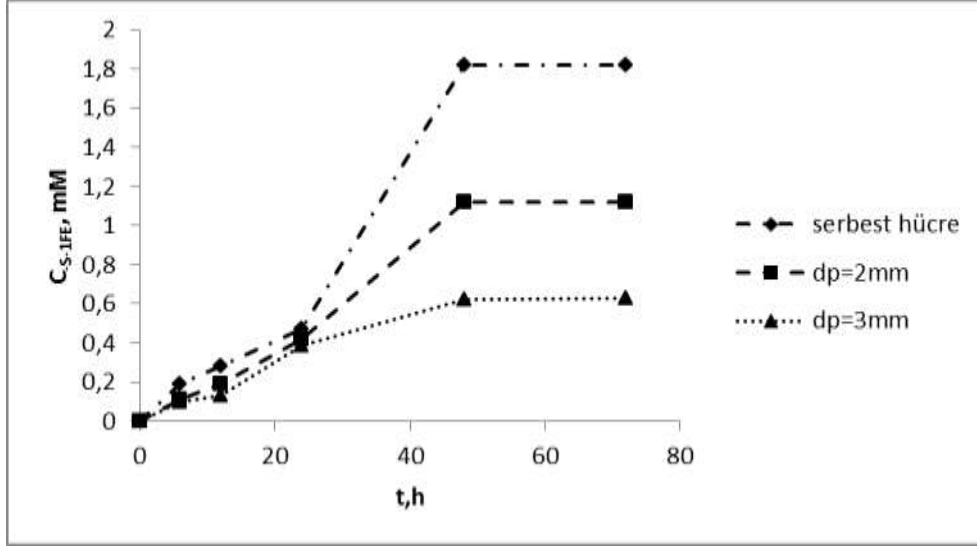
Şekil 4.46 Serbest ve tutuklanmış hücre ile (S)-1-feniletanol derişiminin değışimi ($C_{S_0} = 1$ mM, pH 7.6 Tris Tamponu, $T = 33$ °C, $N = 150$ rpm, $C_{CaCl_2} = 0.05$ M)



Şekil 4.47 Serbest ve tutuklanmış hücre ile (S)-1-feniletanol derişiminin değişimi ($C_{S_0}=1.5$ mM, pH 7.6 Tris Tamponu, $T=33$ °C, $N=150$ rpm, $C_{CaCl_2}=0.05$ M)



Şekil 4.48 Serbest ve tutuklanmış hücre ile (S)-1-feniletanol derişiminin değişimi ($C_{S_0}=2$ mM, pH 7.6 Tris Tamponu, $T=33$ °C, $N=150$ rpm, $C_{CaCl_2}=0.05$ M)



Şekil 4.49 Serbest ve tutuklanmış hücre ile (S)-1-feniletanol derişiminin değişimi ($C_{S_0}=4$ mM, pH 7.6 Tris Tamponu, $T=33$ °C, $N=150$ rpm, $C_{CaCl_2}=0.05$ M)

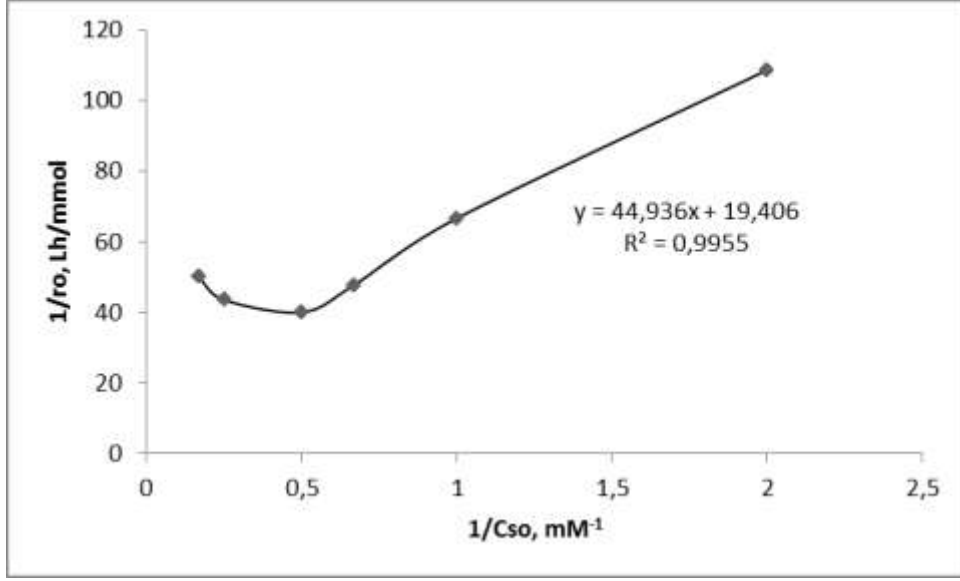
Şekil 4.46-4.49'dan yararlanarak başlangıç tepkime hızları hesaplanmıştır ve Michaelis-Menten kinetik sabitlerini bulabilmek amacıyla Lineweaver-Burk grafiği ile doğrusallaştırma yapılmıştır ve $1/C_{S_0} - 1/r_0$ değişimi grafiğe geçirilerek, kinetik sabitler K_M ve r_{maks} sırasıyla eğim ve kaymadan hesaplanmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 Serbest taze havuç, tutuklanmış havuç biyokatalizörleri için başlangıç tepkime hızı- başlangıç substrat derişimi değişimi

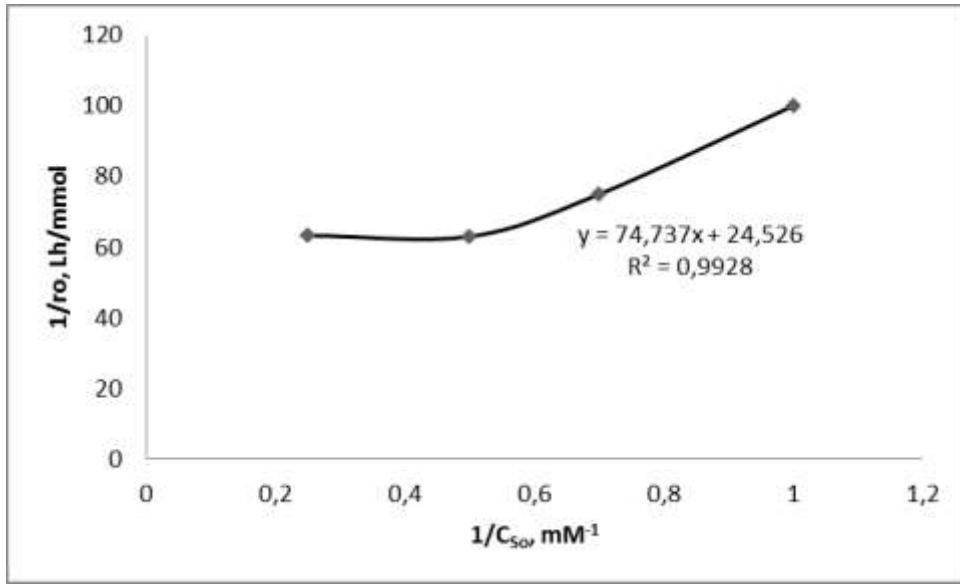
Serbest taze havuç		
C_{so}, mM	r₀, mmol/Lh	r₀, g_{substrat}/g_{biyokatalizör} h (10⁻⁵)
1	0.015	0.9075
1.5	0.021	1.2700
2	0.025	1.5100
4	0.023	1.3900
2 mm çapında tutuklanmış taze havuç		
C_{so}, mM	r₀, mmol/Lh	r₀, g_{substrat}/g_{biyokatalizör} h (10⁻⁶)
1	0.0100	6.0500
1.5	0.0133	3.2180
2	0.0160	3.8720
4	0.0158	3.8230
3 mm çapında tutuklanmış taze havuç		
C_{so}, mM	r₀, mmol/Lh	r₀, g_{substrat}/g_{biyokatalizör} h (10⁻⁶)
1	0.0075	1.8150
1.5	0.0108	2.6136
2	0.0125	3.0250
4	0.0108	2.6136

Çizelge 4.9 Lineweaver-Burk için Serbest ve farklı çaplarda tutuklanmış biyokatalizörlerin başlangıç hızları

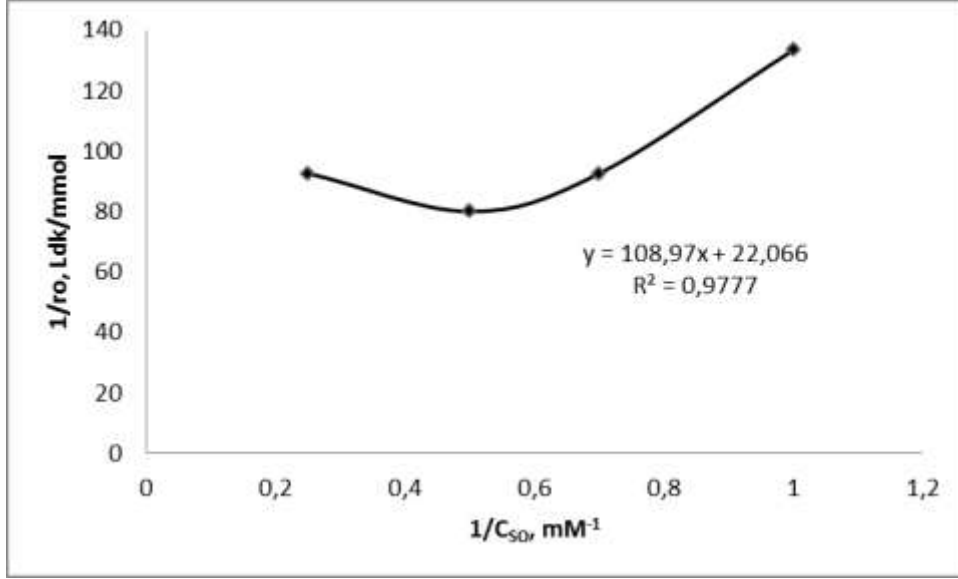
Serbest taze havuç			
C _{so} , mM	r _o , mmol/Lh	1/ r _o , Lh/mmol	1/C _{so} , mM ⁻¹
1	0.015	66.666	1
1.5	0.021	47.619	0.66
2	0.025	40.000	0.5
4	0.023	43.478	0.25
2mm çapında tutuklanmış taze havuç			
C _{so} , mM	r _o , mmol/Lh	1/ r _o , Lh/mmol	1/C _{so} , mM ⁻¹
1	0.0100	100	1
1.5	0.0133	75	0.66
2	0.0160	63	0.5
4	0.0158	64	0.25
3mm çapında tutuklanmış taze havuç			
C _{so} , mM	r _o , mmol/Lh	1/ r _o , Lh/mmol	1/C _{so} , mM ⁻¹
1	0.0075	133.333	1
1.5	0.0108	92.592	0.66
2	0.0125	80.000	0.5
4	0.0108	92.592	0.25



Şekil 4.50 Serbest biyokatalizör ile Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.51 2 mm çapında tutuklanmış hücre ile Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.52 3 mm çapında tutuklanmış hücre ile Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.50-4.52 yardımı ile Michaelis-Menten kinetik sabitleri K_M ve r_{maks} sırasıyla eğim ve kaymadan hesaplanmış (EK 5) ve sonuçlar çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

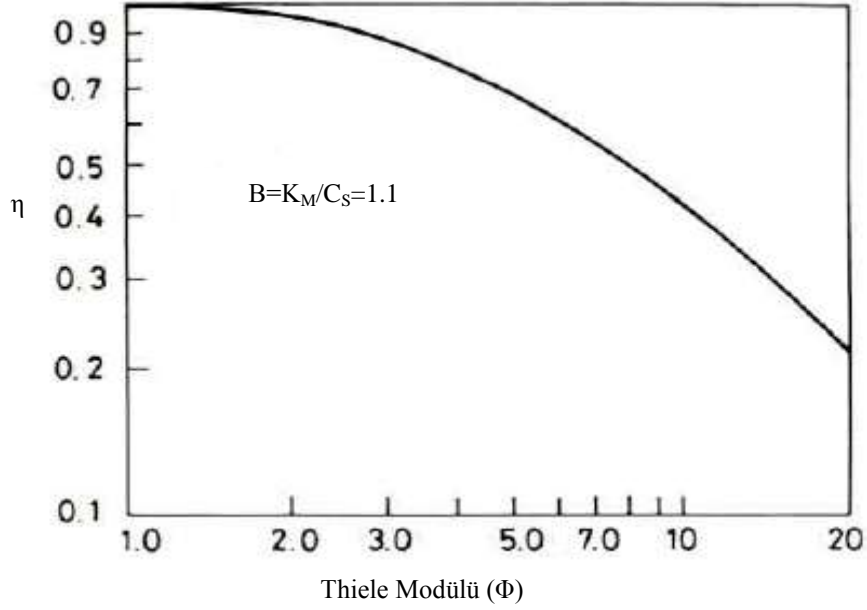
Çizelge 4.10 Serbest ve tutuklanmış hücreler için toplu sonuçlar

	K_M (mmol/L)	r_{maks} (mmol/Lh)
Serbest hücre	2.3142	0.0515
Tutuklanmış hücre	$K_{Mgöz}$ (mmol/L)	$r_{maksgöz}$ (mmol/Lh)
Dp1= 2 mm	3.0472	0.0407
Dp2= 3 mm	4.9383	0.0453

Serbest ve tutuklu enzime ait bu değerler karşılaştırıldığında ADH enziminin tutuklama ile K_M değerinin, difüzyon sınırlamaları nedeniyle arttığı ve böylece enzimin substratına olan ilgisinin azaldığı görülmektedir.

Katalizör partiküllerde difüzyon ve reaksiyon olaylarını incelemek için Thiele modülü ve substratın katalizör içine ne kadar difüzlendiğinin bir ölçüsü olan etkinlik katsayısı değerleri belirlenmiştir (EK 6).

Etkinlik faktörü ile gözlenen Thiele modülü arasındaki ilişki boyutsuz Michaelis-Menten sabitine ($\beta = K_M / C_s$) bağlı olarak verilmektedir.



Şekil 4.53 Etkinlik faktörü (η) ile gözlenen Thiele modülünün (Φ) boyutsuz substrat derişimi ile değişimi (Lee vd.. 1976)

Çizelge 4.11 Etkinlik katsayısı, Thiele modülü ve etkin difüzyon katsayısı değerleri

Dp1= 2 mm				
$r_{göz1}$, mmol/Lh	$r_{gerçek}$ mmol/Lh	$\eta_1 = \frac{r_{göz1}}{r_{gerçek}}$	$\Phi_1 = \frac{r_{göz}}{De_1 C_o} \left(\frac{R}{3}\right)^2$	De_1 , cm ² /s
0.0161	0.0238	0.6764	4.6	$1.949 \cdot 10^{-6}$
Dp2= 3 mm				
$r_{göz2}$, mmol/Lh	$r_{gerçek}$ mmol/Lh	$\eta_2 = \frac{r_{göz2}}{r_{gerçek}}$	$\Phi_2 = \frac{r_{göz}}{De_2 C_o} \left(\frac{R}{3}\right)^2$	De_2 , cm ² /s
0.0130	0.0238	0.5462	8.2	$1.981 \cdot 10^{-6}$

Çizelge 4.11'de görüldüğü üzere partikül büyüklüğünün artması ile Thiele modülü artmış, etkinlik katsayısı ise azalmıştır.

Bu durum parçacık içindeki difüzyonunun çok yavaş olduğunu, substratın difüzyon kısıtlanması sonucu katalizörün iç bölümlerine ulaşmadan tepkimeye girdiğini, katalizör

taneciğinin ancak küçük bir kesrinin etkin olarak kullanılabilirdiğini göstermektedir. Tanecik çapı büyüdükçe etkinlik katsayısının daha da küçülmesi, difüzyon kısıtlamalarından dolayı teorik olarak da beklenen bir sonuçtur.

Asetofenonun aljinat jelindeki etkin difüzyon katsayısına literatürde (% 1.5 w/w) aljinat derişimi için $3.24 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak rastlanmıştır (Wu vd., 1994). Bu çalışmada (% 2 w/w) aljinat jelinde ortalama $1.96 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak bulunmuştur. Jel içindeki difüzyonun güçleşmesi nedeniyle difüzyon katsayısının düşmesi beklenen bir sonuçtur (Mota vd. 2001).

Asetofenonun sudaki diffüsitivitesi $9.21 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 'dir (Bird 1960). Beklenildiği gibi, asetofenonun farklı tutuklama matrislerindeki difüsitivitesi, sudakinden küçüktür.

4.8 Sürekli Sistemde (S)-1-Feniletanol Üretimi

Asetofenonun tutuklanmış taze havuç biyokatalizörleri ile enantiyoseçimli biyoindirgenme tepkimesinin sürekli sistemde uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla dolgulu kolon biyoreaktörde sabit substrat ve biyokatalizör derişiminde farklı akış hızlarında zamanla substrat dönüşümü izlenmiştir.

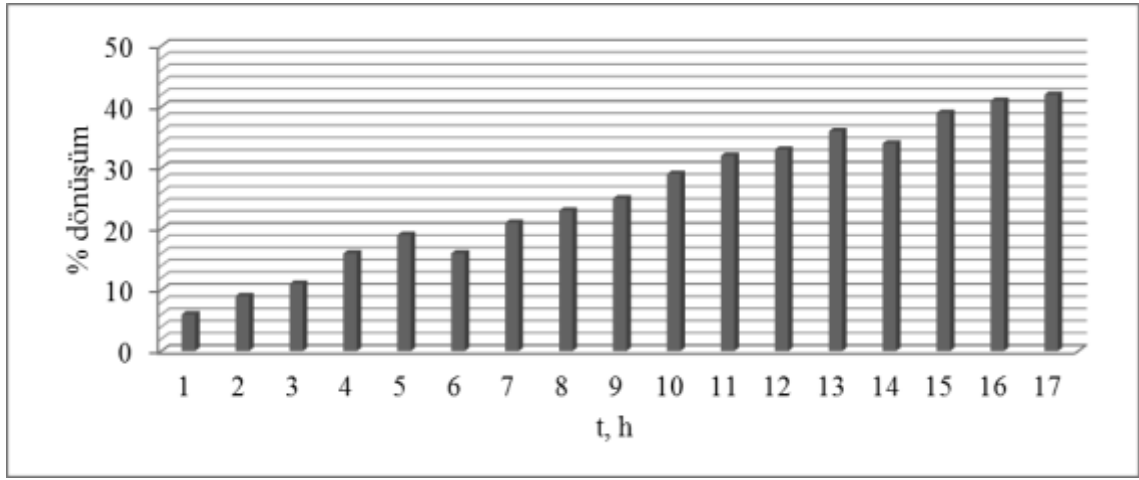
Çalışmada, 27 cm boyunda ve 1.7 cm çapında 50 mL hacminde, çift cidarlı sabit yataklı dolgulu kolon biyoreaktör kullanılmıştır. Reaktöre 10 g tutuklanmış taze havuç hücreleri doldurulmuştur. Peristaltik pompa farklı akış hızlarında çalıştırılarak, reaktörden besleme çözeltileri geçirilmiştir. Belli zaman aralıklarında reaktörden çıkan substrat ve ürün karışımından alınarak analize hazırlanmıştır. Sıcaklık kolon cidarından geçirilen su ile 33 °C'de sabit tutulmuştur.

Kesikli sistemde tutuklanmış taze havuç biyokatalizörleri ile gerçekleştirilen biyoindirgenme deneylerinde 2 mM (0.24 g/L) substrat derişiminden sonra inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Sürekli sistemde bu derişimde dolgulu kolon deneyleri çalışılmıştır.

4.8.1 Alıkonma süresinin belirlenmesi

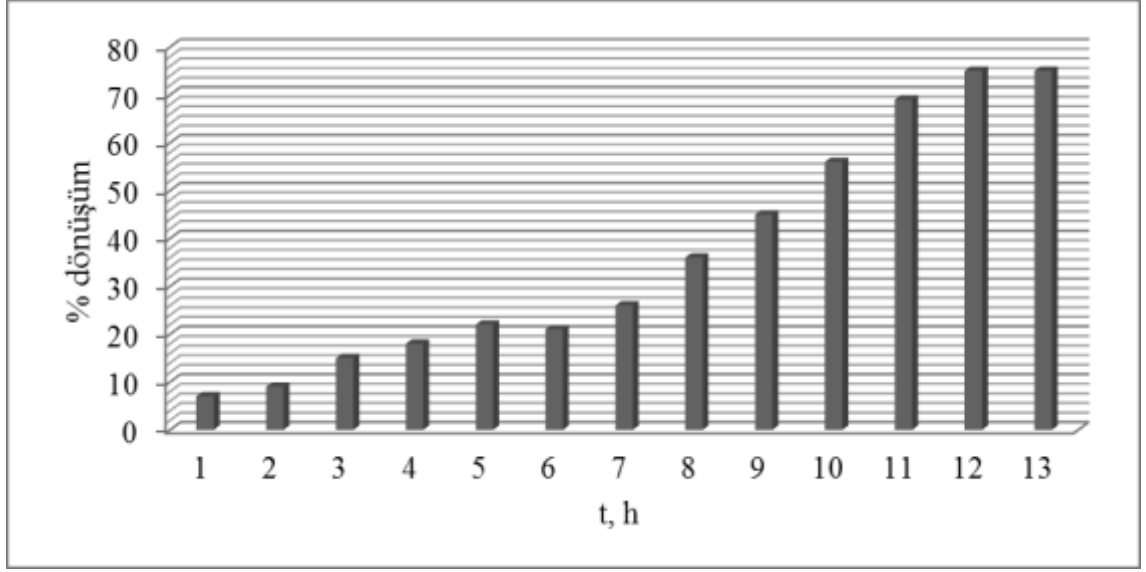
Peristaltik pompa farklı akış hızlarında çalıştırılarak, reaktörden 2 mM'lık asetofenon çözeltisi geçirilmiştir. Bölüm 3.3.8' de anlatıldığı şekilde kolon gözenekliliği $\epsilon = 0.33$ olarak belirlenmiş ve çözeltinin alıkonma süresi (τ) hesaplanmıştır.

Farklı kalma sürelerinde çalışılırken, sürekli sistemde saat başı örnek alınmış ve yatışkın koşula gelme zamanı tespit edilmeye çalışılmıştır (Şekil 4.54).



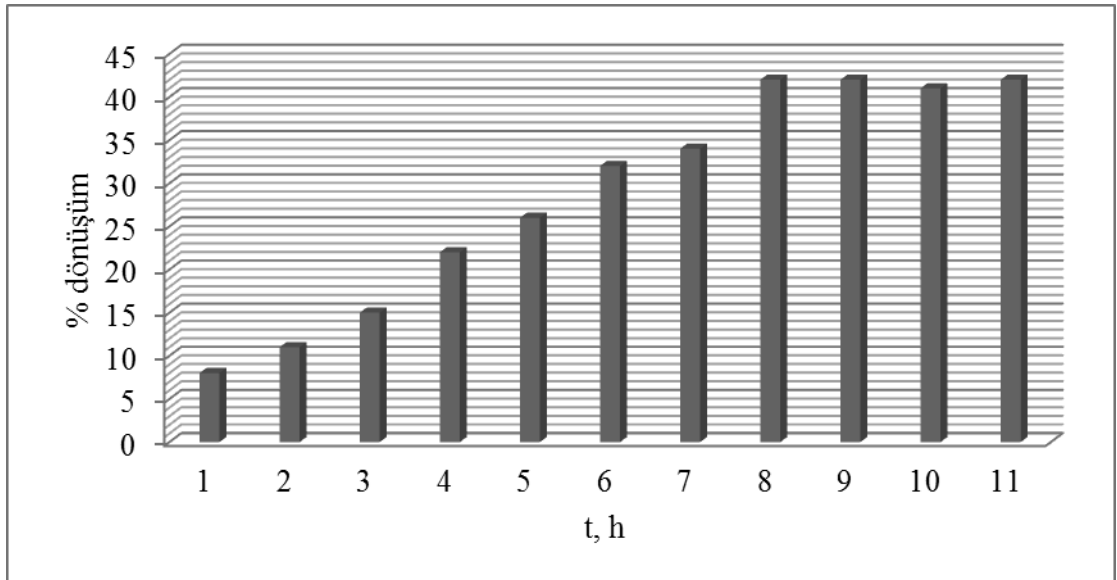
Şekil 4.54 7 h kalma süresinde kolon çıkış akımının zamanla değişimi ($C_{So}=2$ mM, $pH=7.6$ Tris tamponu, $C_{Alj}=\% 2$ w/v, $d_p= 2$ mm, $C_{bt}=500$ g/L, $T=33$ °C, $C_{CaCl_2}=0.05$ M)

7 h kalma süresinde, sistem yaklaşık olarak 17 saatte yatışkın hale gelmektedir. Ulaşılan maksimum dönüşüm % 48, % ee >99'dür.



Şekil 4.55 4 h kalma süresinde kolon çıkış akımının zamanla değişimi ($C_{S0}=2$ mM, pH=7.6 Tris tamponu, $C_{Aij}=\% 2$ w/v, $dp= 2$ mm, $C_{bt}=500$ g/L, $T=33$ °C, $C_{CaCl2}=0.05$ M)

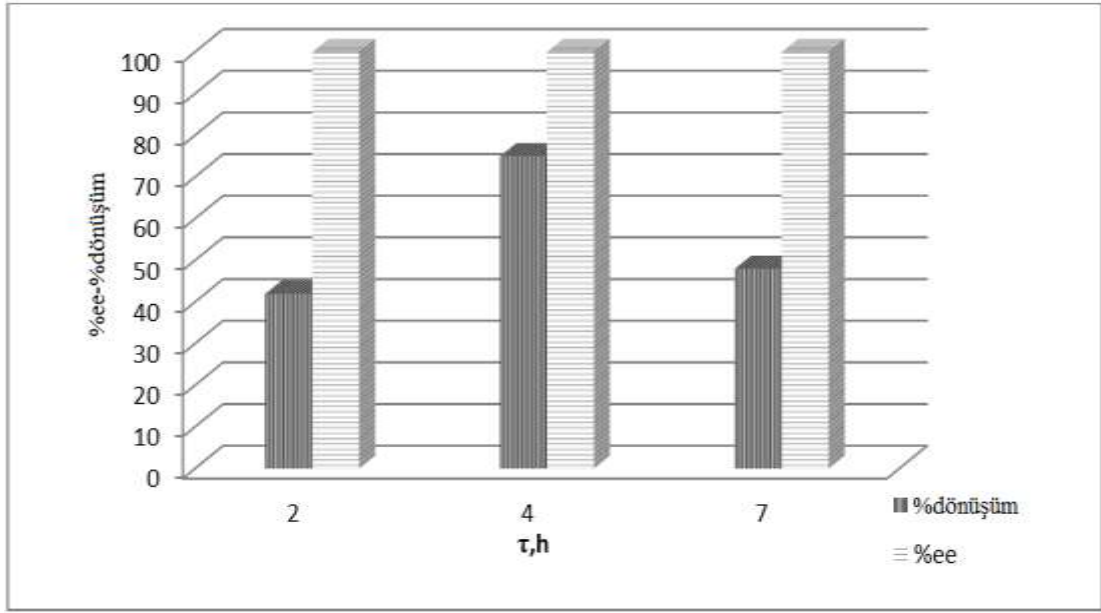
4 h kalma süresinde, sistem yaklaşık olarak 12 saatte yatışkın hale gelmektedir. Ulaşılan maksimum dönüşüm % 75, % >99 ee.



Şekil 4.56 2 h kalma süresinde kolon çıkış akımının zamanla değişimi ($C_{S0}=2$ mM, pH=7.6 Tris tamponu, $C_{Aij}=\% 2$ w/v, $dp= 2$ mm, $C_{bt}=500$ g/L, $T=33$ °C, $C_{CaCl2}=0.05$ M)

2 h kalma süresinde, sistem yaklaşık olarak 8 saatte yatışkın hale gelmektedir. Ulaşılan maksimum dönüşüm % 42, % >99 ee.

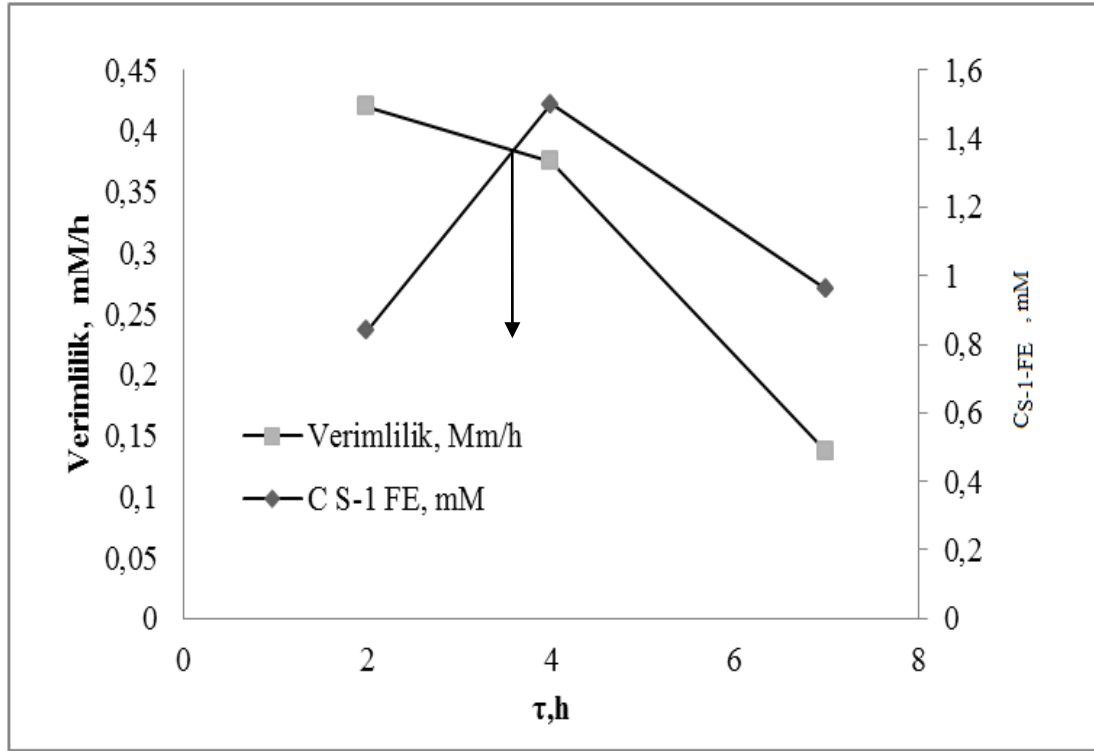
Alıkonma süresi arttıkça, yatışkın koşula gelme süresi de artmıştır. Düşük akış hızlarında 12-17 saatte, yüksek akış hızında ise daha kısa sürede (8 saat) yatışkın koşula ulaşılmıştır.



Şekil 4.57 Yatışkın halde farklı kalma sürelerinde % dönüşüm ve % ee değerleri ($C_{So}=2$ mM, pH=7.6 Tris tamponu, $C_{Alj}=\%2$ w/v, $d_p=2$ mm, $C_{bt}=500$ g/L, $T=33$ °C, $C_{CaCl_2}=0.05$ M)

Şekil 4.57' de de görüldüğü gibi, akış hızının artması ile dönüşüm hızı artmış ve daha sonra yüksek akış hızlarında azalmıştır. Akış hızının artması ile partikül yüzeyindeki kütle aktarım dirençlerinin azalmış ve enzim substrat etkileşiminin verimliliği artmıştır (Cho vd. 1978).

Düşük akış hızlarında tanecikler etrafındaki film tabakası direnci kırılmadığından tepkime hızları da düşüktür. Yüksek besleme akış hızlarına çıkıldığında ise alıkonma süresi çok azaldığı için tepkime hızında bir azalma gözlenmiştir. Bunun nedeni hızlı akış hızlarında alıkonma süresinin düşük olmasından dolayı enzimle substrat arasında yeterli etkileşimin gerçekleşmemesidir (Şekil 4.58).



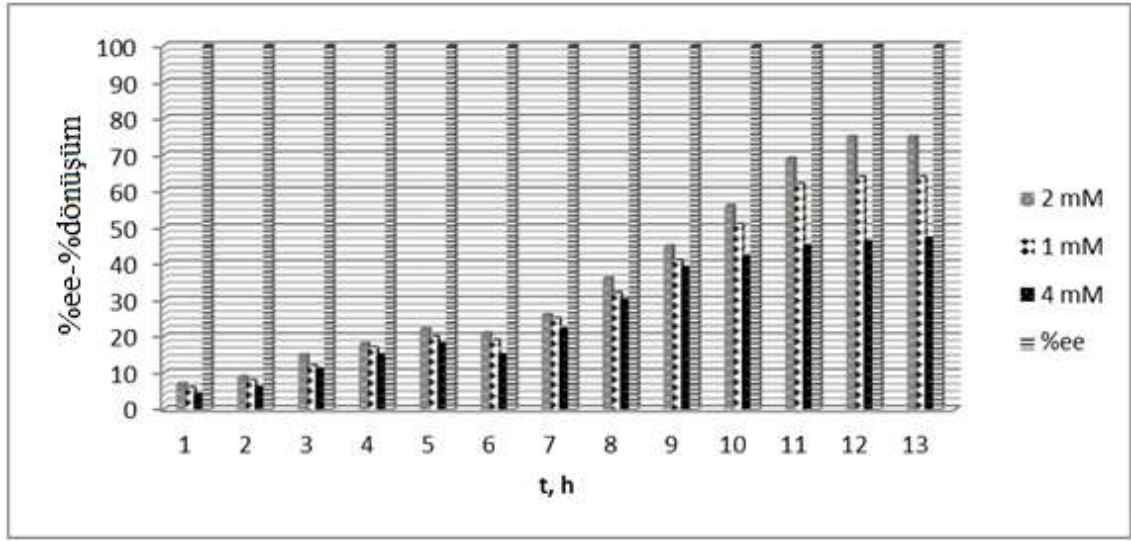
Şekil 4.58 Kalma süresinin verimlilik ve (S)-1-feniletanol derişimine etkisi
 ($C_{S_0}=2$ mM, pH=7.6 Tris tamponu, $C_{Aij}=\% 2$ w/v, $d_p=2$ mm, $C_{bt}=500$ g/L,
 $T=33$ °C, $C_{CaCl_2}=0.05$ M)

Şekil 4.58'de alıkonma süresinin (τ) artması ile verimlilik azalırken ürün derişimi 4 h' te kadar artmaktadır. Hem verim hemde ürün derişimi açısından optimum alıkonma süresi değeri 3.75 h olarak görülmektedir.

Yüksek dönüşüm değerlerine ulaşmak için film dirençlerinin yüksek hızlarda çalışılarak minimum düzeyde tutulabilmesi gerekir fakat bu sistem için 4 mL/h değerinin üzerine çıkılmamalıdır.

4.8.2 Substrat derişimi etkisi

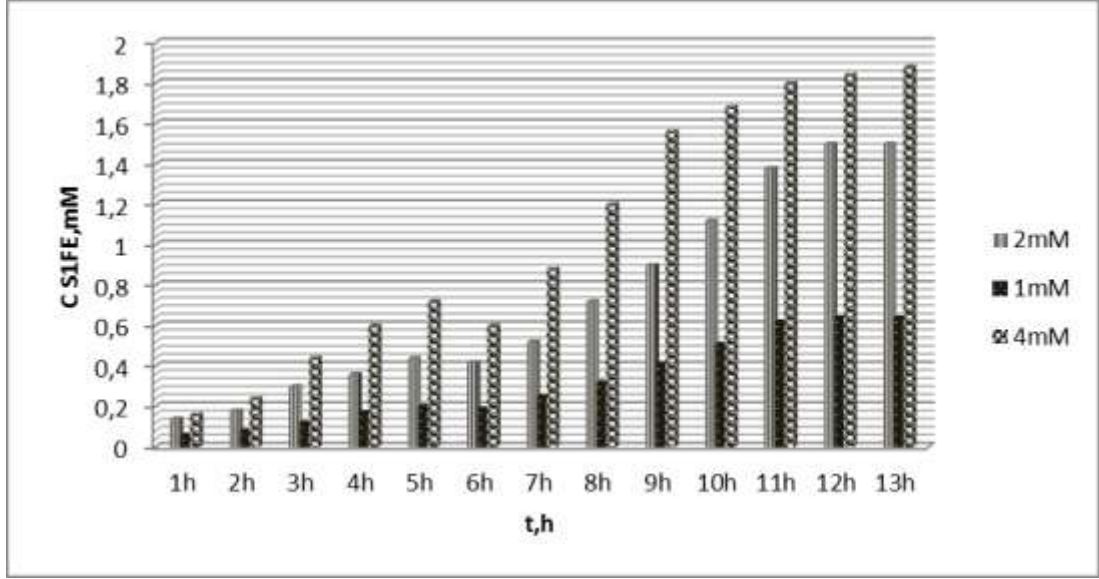
Bu denemelerde ise 1, 2 ve 4 mM (0.12-0.24-0.48 g/L) substrat derişiminde besleme çözeltileri uygun alıkonma süresinde reaktörden geçirilmiştir. Belli zaman aralıklarında reaktörden çıkan çözeltiden alınan örneklere ait dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerleri grafikte görülmektedir.



Şekil 4.59 Substrat derişiminin zamanla enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm üzerine etkisi ($\tau=4$ h, pH=7.6 Tris tamponu, $C_{Alj}=\% 2$ w/v, $dp=2$ mm, $C_{bt}=500$ g/L, $T=33$ °C, $C_{CaCl_2}=0.05$ M)

Substrat derişimi 2 mM iken yatışkın koşulda % 75 dönüşüm elde edilmiştir. Substrat derişiminin artması, substrat inhibisyonundan dolayı dönüşümü olumsuz yönde etkilemiştir.

Şekil 4.60'da ise, substrat derişiminin ürün derişimi ile değişimi gözlenmektedir. Substrat derişimi arttıkça ürün derişimi de artmıştır. 4 mM substrat derişimi değerinde yüksek ürün derişimi elde edilmesine rağmen dönüşüm ancak % 47'ye ulaşabilmiştir, aynı zamanda yüksek dönüşüm değeri elde edebilmek için 2 mM substrat derişiminde çalışmanın daha uygun olduğu düşünölmüştür.

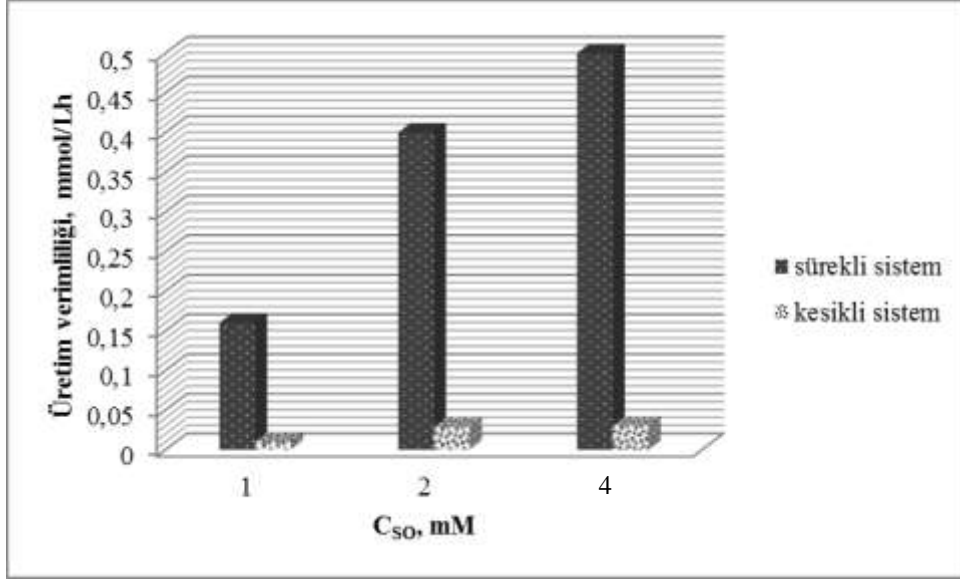


Şekil 4.60 Substrat derişiminin biyoundirgemeye etkisi ($\tau=4$ h, pH=7.6 Tris tamponu, $C_{Alj}=\% 2$ w/v, $dp=2$ mm, $C_{bt}=500$ g/L, $T=33$ °C, $C_{CaCl_2}=0,05$ M)

4.9 Üretim Verimliliğinin Belirlenmesi

Üretimlerde başlıca hedef, kesikli sistem ile uygun üretim koşullarının belirlenmesinin ardından büyük ölçekte yüksek verimlilikte üretimin sağlanmasıdır. Verimlilik belirli sürede üretilen ürünün birim hacim ve birim zamandaki miktarıdır (Eşitlik 4.27).

$$Verimlilik = \frac{\text{üretilen ürün (mmol)}}{\text{tepkime hacmi (L)} \times \text{süre (h)}} \quad (4.27)$$



Şekil 4.61 Sürekli ve kesikli sistemde üretim verimliliği

Sürekli prosesin avantajı genellikle verimliliğin diğerlerine göre daha yüksek olmasıdır. Şekil 4.61'den de görüldüğü gibi, sürekli sistemde kesikli sisteme göre tüm substrat derişimi için çok daha iyi bir verimlilik elde dılmıştır.

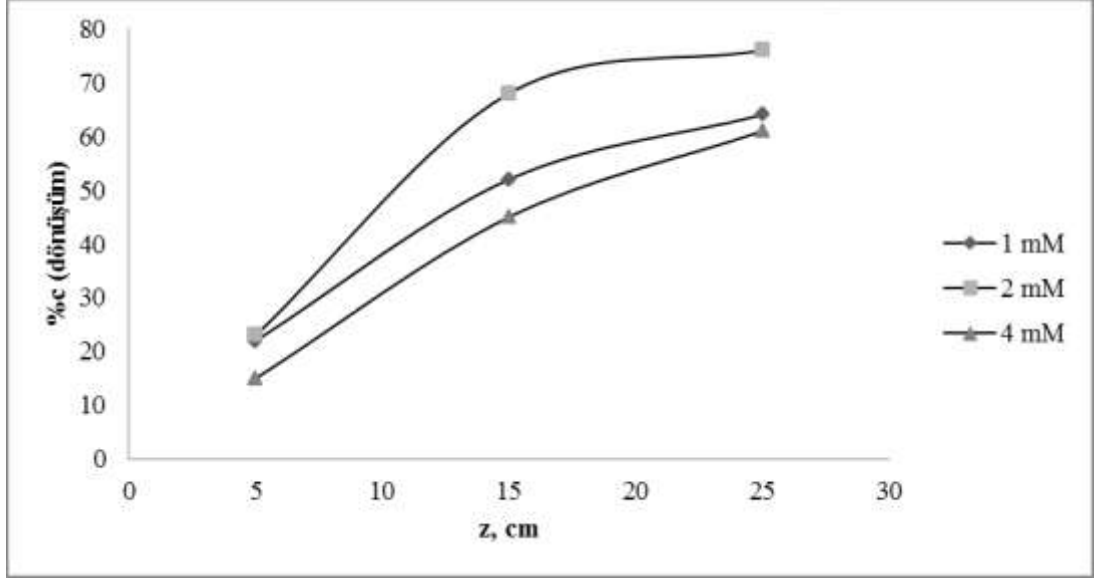
4.10 Kimya Mühendisliğinde Modelleme

Modelleme için altın kural: her zaman bilinen fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal kavramlara dayanan en basit ve uygun modeli kullanmak olmalıdır. Modeller ne kadar basit olursa kullanımı o kadar kolaydır (Türker 2005).

Kimyasal proses problemlerinin modern anlamda analizi, genellikle bir takım matematiksel modeller gerektirir. Bu amaçla, dolgulu kolon biyoreaktörde, Re sayısı hesabı, boş ve dolu kolon hızları hesaplanmıştır (EK 7).

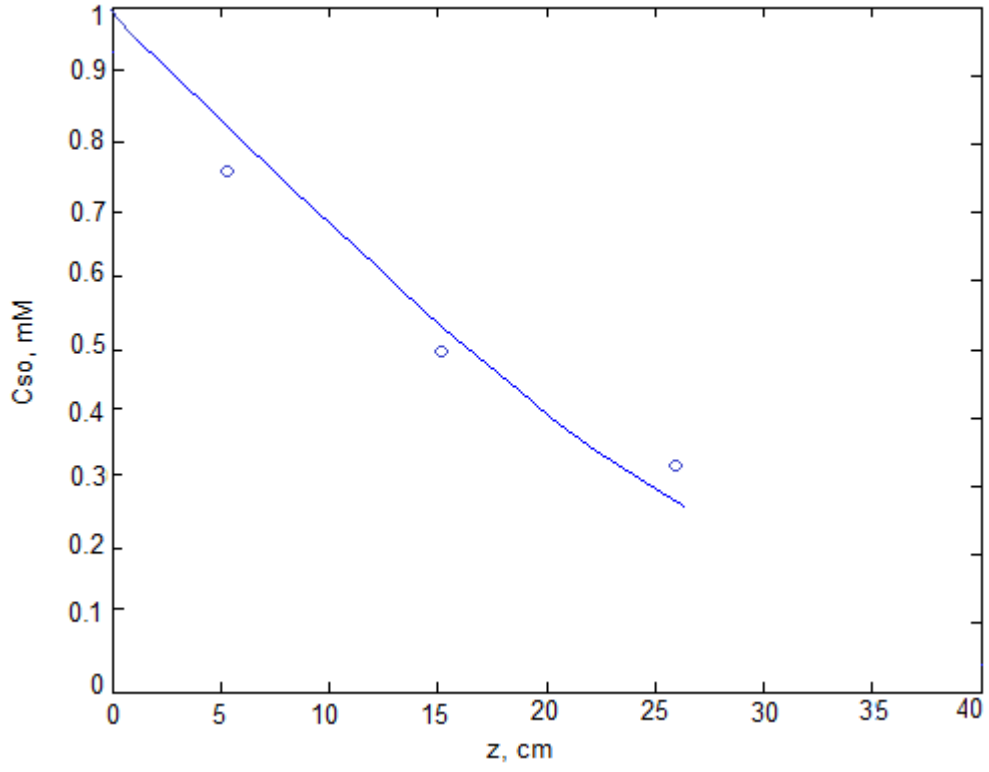
$Re=0.02 \ll 10$ olduğundan kolon Laminer akışlıdır. Dağılma katsayısı aynı reaktörde $Dz=2.2 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ hesaplanmıştır (Aydoğan 2011). Bu veriler ışığında, dolgulu kolon biyoreaktörün modeli, MATLAB paket programı kullanılarak çözülebilir. Dolgulu kolon biyoreaktör modeli boyutsuz gruplar cinsinden Bölüm 2'de anlatıldığı gibi çıkarılmış ve çözülmüştür (EK 8).

$$-\frac{d\Psi}{d\lambda} + \frac{1}{Pe} \frac{d^2\Psi}{d\lambda^2} + \frac{L}{V_z C_{A0}} r_T = 0 \quad (4.28)$$

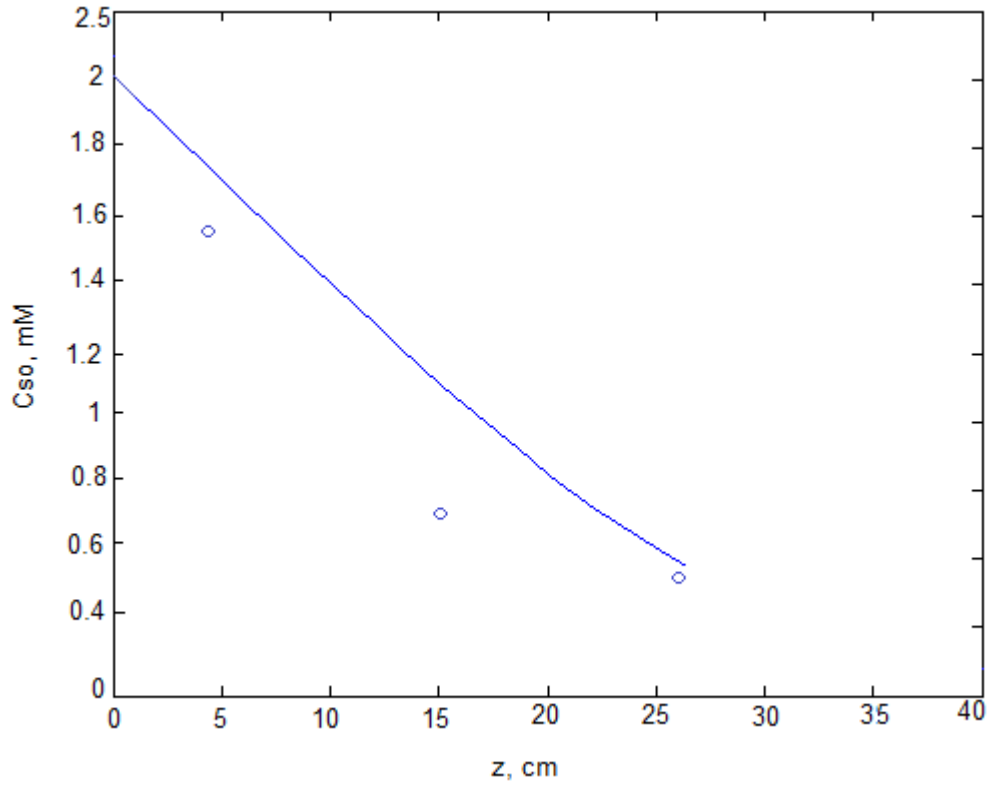


Şekil 4.62 Farklı başlangıç substrat derişimlerinde konum ile dönüşüm değişimi için deneysel veriler ($\tau=4$ h, pH=7.6 Tris tamponu, $C_{Alj}=\% 2$ w/v, $d_p=2$ mm, $C_{bt}=500$ g/L, $C_{CaCl_2}=0,05$ M $T=33$ °C)

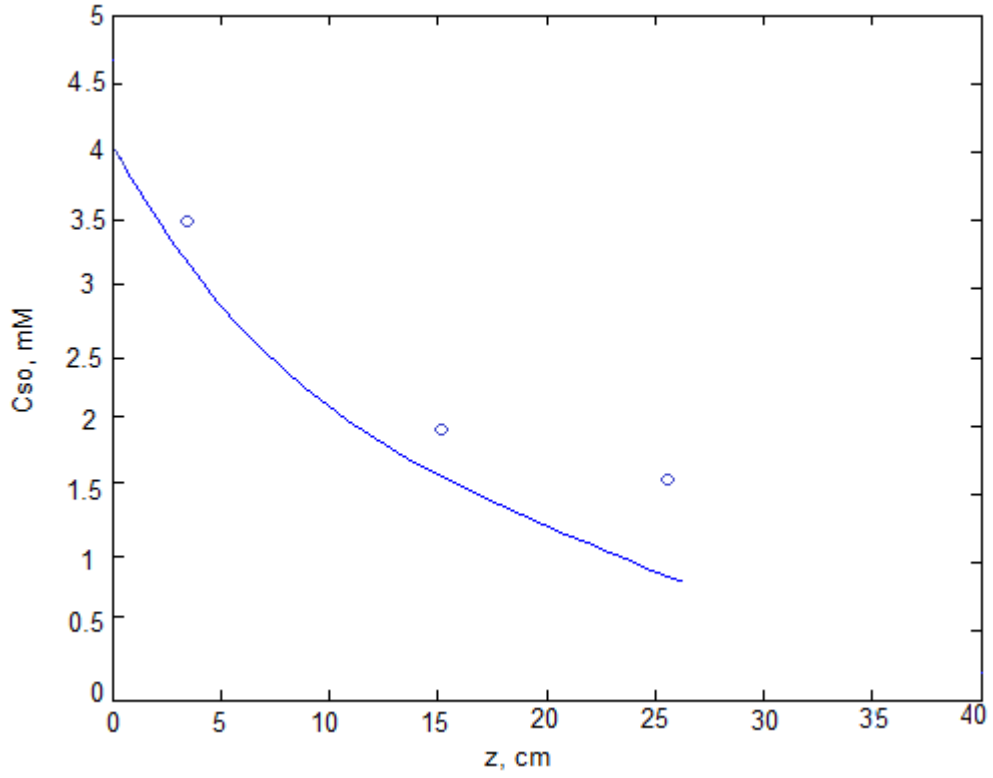
Farklı başlangıç substrat derişimlerinde, model çözümü ve deneysel verilerin karşılaştırması görülmektedir (Şekil 4.63-4.65).



Şekil 4.63 1 mM başlangıç derişiminde model (—) ve deney (o) sonuçlarının karşılaştırılması ($\tau=4$ h, pH=7.6 Tris tamponu, $C_{Alj}=\% 2$ w/v, $d_p=2$ mm, $C_{bt}=500$ g/L, $T=33$ °C, $C_{CaCl_2}=0.05$ M)



Şekil 4.64 2 mM başlangıç derişiminde model (—) ve deney (o) sonuçlarının karşılaştırılması ($\tau=4$ h, pH=7.6 Tris tamponu, $C_{Alj}=\% 2$ w/v, $d_p=2$ mm, $C_{bt}=500$ g/L, $T=33$ °C, $C_{CaCl_2}=0.05$ M)



Şekil 4.65 4 mM başlangıç derişiminde model (—) ve deney (o) sonuçlarının karşılaştırılması ($\tau=4$ h, pH=7.6 Tris tamponu, $C_{Alj}=\% 2$ w/v, $d_p=2$ mm, $C_{bt}=500$ g/L, $T=33$ °C, $C_{CaCl_2}=0.05$ M)

Literatürde bitki biyokatalizörlüğünde biyoindirgeme için modelleme çalışmasına rastlanmamıştır. Şekil 4.63-4.65'den görüldüğü gibi, modelden elde edilen sonuçlarla, deneysel veriler uyum içerisindedir.

Modelin deneysel verilerle uyumlu olduğu gösterildikten sonra artık model biyoreaktörün performansını çeşitli işletme koşulları altında öngörmek, yeni proses tasarımı yapmak, optimizasyon ve kontrol için kullanılır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Organik sentezdeki en önemli amaçlardan biri spesifik stereoizomerleri saf halde elde edebilmektir. Bu, özellikle sadece bir izomerin biyolojik aktiviteye sahip olduğu ilaçların üretiminde oldukça önemlidir. Bu amaçla, ilaç üreticileri hem toplam verimi düşüren hem de maliyeti artıran uzun ayırma işlemlerini gerçekleştirmek durumunda kalabilirler. Bu bakımdan enzimlerin ve mikroorganizmaların kullanılması paha biçilmezdir; çünkü bunlar genellikle sadece saf stereoizomerleri verirler.

Tüm hücre otomatik olarak metabolik yol izleyebildiğinden dolayı kofaktör rejenerasyonu için kofaktör döngüsüne ihtiyaç duymaz. Mikrobiyal dönüşümlerin verimliliği genellikle düşük olur. Çünkü doğal olmayan substratlar çoğunlukla yaşayan organizmaya toksik etki yaparlar ve düşük konsantrasyonlarda tolere edilebilirler (hacim başına ~ % 0.1 - 0.3).

Son yıllarda, biyokatalizör olarak bitki hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen biyokatalitik reaksiyonlar, bitkilerin sentezlenen kimyasal maddelere göre yan etkilerinin daha az olması ve maliyetlerinin düşük olması nedeni ile dikkat çekmektedir.

Asetofenonun enantiyoseçimli biyoindirgenmesi ile pek çok farmakolojik ürünün çıkış maddesi olan 1-fenil-etanolün üretimi, *ADH* kaynağı olarak 16 U/L ve 10 U/L hücre içi enzim aktivitesine sahip taze ve liyofilize havuç biyokatalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında enantiyomerik saflıkta 1-fenil-etanol üretimine biyokatalizör türü, substrat derişimi, sıcaklık, süre, tepkime pH 'sı ve biyokatalizör miktarının etkisi araştırılmıştır. Enantiyoseçimli asimetric biyoindirgenme tepkimesinde biyokatalizör olarak kullanılan taze ve liyofilize havuç içindeki *ADH* enzimi tepkimeyi yüksek enantiyoseçimlilikte % >99 ve 2 mM (0.24 g/L) başlangıç substrat derişiminde, taze havuç için % 92 dönüşümle, 0.5 mM (0.06 g/L) liyofilize havuç için % 78 dönüşümle katalizlemiştir.

Kütle transferi parçacıkların ara yüzeyinde gerçekleştiği için ne kadar küçük parçacık olursa o kadar geniş yüzey alanı olacağından, biyokatalizör olarak taze havucun

kullanıldığı çalışmalarda öncelikle biyokatalizör uygun bir rende ile minimum parçacık boyutuna küçültülmüştür. Biyokatalizör miktarı olarak, hem tepkimenin maliyeti hem de tepkimeyi yüksek enantiyoseçimlilikte katalizlemesi bakımından yapılan ön denemeler sonucunda, 2 mM (0.24 g/L) başlangıç substrat derişiminde, 200 g/L biyokatalizör miktarının % >99 ee ve % 92 dönüşüm ile uygun olduğu görülmüştür.

Tepkime sıcaklığı enzimatik tepkimeler üzerinde büyük etkiye sahiptir. Yapılan deneylerde sıcaklığın enantiyomerik aşırılık değerini etkilemediği görülmüştür. Enantiyomerik aşırılık değeri tüm sıcaklıklarda % >99 iken 33 °C'de diğer sıcaklıklara göre daha yüksek dönüşüm, 2 mM (0.24 g/L) başlangıç substrat derişiminde, (% 92) elde edilmiştir. Enzimler diğer katalizörlerden farklı olarak protein yapılarından dolayı sıcaklığa bağıdırlar. Belli bir sıcaklıktan sonra enzim denatüre olmaya başlar ve bu nedenle dönüşümün azalması, oksido redüktaz olan ADH enziminin yüksek sıcaklıkta aktifliğini yitirmesi ile açıklanmıştır.

Dehidrogenaz tepkimeleri biyotransformasyon çalışmalarında tepkimenin yönüne göre tercih edilen asidik ya da bazik pH koşullarında tampon çözelti ortamında gerçekleştirilir. Her enzimin en iyi çalıştığı bir pH aralığı vardır. Aşırı asidik ve bazik ortamlardan etkilenirler. Genellikle nötr ortamlarda çalışırlar. Bazı hallerde enzimler en yüksek pH etkinliğini belirli bir pH derecesinde gösterirler. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir. Optimum pH'ın her iki yanında da enzim aktivitesi yavaşlar, bu çalışmada taze ve liyofilize havuç için optimum pH değerinin, 2 mM (0.24 g/L) başlangıç substrat derişiminde, 7 olduğu görülmüştür.

Liyofilize havuç ile yapılan biyoindirgenme deneylerinde reaksiyon süresi kısalmadığı gibi serbest hücrelerle elde edilen dönüşümlerden daha düşük dönüşümler elde edilmiştir. Uygulanan dondurma hızı, kurutulmuş ürünün rekonstitüsyon özellikleri için son derece önemlidir. Dondurma işlemi ne kadar hızlı olursa, o kadar küçük ve fazla sayıda buz kristali oluşacağından, kurumuş üründe o kadar fazla gözenek ortaya çıkar. Böylece ürünün rehidrasyon hızı yüksektir ve rehidrasyon tamdır. Rehidrasyon, kurutulmuş ürüne tekrar su verildiğinde ürünün tekrar kurutma önceki haline dönüşebilmesidir. Bu çalışmada uygulanan kurutma hızı yavaş olduğundan yüksek

enantiyoseçimlilik % >99 elde edilmesine rağmen, 0.5 mM (0.06 g/L) başlangıç substrat derişiminde, maksimum dönüşüm % 78 değerinde kalmıştır.

Çalışma kapsamında, *ADH* enzimi açısından zengin bir bitkisel kaynak olan Havuçtan (*D. carota*) yararlanılarak yapılan biyoindirgeme deneylerine tutuklama çalışmaları ile devam edilmiştir. Tutuklama alginat jelinde gerçekleştirilmiş ve taze havuç hücreleri ve liyofilize havuç hücreleri ile tutuklanmış *ADH*'ın optimum pH ve sıcaklık, reaksiyon süresi, aljinat derişimi, K_M ve r_{maks} kinetik sabitleri, yeniden kullanılabilirlik gibi bazı biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Tutuklanmış havuç hücreleri ile biyoindirgenme tepkimeleri sırasında Tris tamponu (pH 7.6) kullanılmıştır. Birçok literatürde sodyum-potasyum fosfat tamponu kullanılmasına rağmen, fosfat tamponları Ca^{+2} iyonlarını jelden uzaklaştırıp polimerde bozulmalara neden olabileceği için bu çalışmada kullanılmamıştır (Fraser ve Bickerstaff 1997).

Tutuklama çalışmalarında kolaylık sağlaması, hızlı ve kolay uygulanabilir bir metot olması nedeniyle sodyum alginat jeli kullanılmıştır. Alginat jeli enzim kaçışını önleyecek ve substratın enzime erişimini de engellemeyecek bir gözenek yapısına sahip olması nedeniyle diğer jellerden üstündür.

Çalışmada literatürde belirtildiği gibi alginat jeli için, jel indükleyici sistem olarak alginat polimeri için $CaCl_2$ çözeltisi gibi katyonik bir çözelti kullanılmıştır (Palmieri vd. 1994).

Sırasıyla % 1, 1.5 ve 2'lik (w/w) derişimlerdeki alginat jellere tutuklanmış taze havuç hücreleri biyokatalizör olarak kullanılarak, alginat derişiminin biyoindirgenme deneyi üzerine etkisi incelenmiştir. Optimum alginat derişimi % 2 olarak bulunmuştur. Artan aljinat derişimi ile enantiyomerik aşırılık değeri etkilenmezken, dönüşümün yüksek difüzyon kısıtlamaları nedeni ile azaldığı gözlenmiştir.

Enzim kaynağı (ADH) olarak kullanılan tutuklanmış taze havuç, (S)-enantiyomer açısından, 2 mM (0.24 g/L) başlangıç substrat derişiminde, yüksek enantiyoseçimliliğe (% >99) ve % 66 dönüşüme sahipken liyofilize havuç hücreleri ile 0.5 mM (0.06 g/L) başlangıç substrat derişiminde (% >99) ve % 50 dönüşüm elde edilmiştir. Yüksek derişimlerde substrat inhibisyonu gözlenmiş ve ilerleyen aşamalarda her biyokatalizör için substrat inhibisyon kinetiği incelenmiştir.

Tutuklama işleminde pellet çapının, (S)-1-feniletanol üretimine etkisini incelemek için % 2 Na-aljinattan elde edilen 3 farklı pellet çapına sahip tutuklanmış taze havuç hücreleri kullanılmıştır. Enzimi farklı pellet çaplarında tutuklayarak (2 mm-3 mm-4 mm) pellet çapı- enantiyomerik aşırılık-dönüşüm arasındaki ilişki incelenmiştir. 2 mm çapındaki pelletler ile 2 mM (0.24 g/L) başlangıç substrat derişiminde, % >99 ee ve % 62 dönüşüm elde edilmiştir. Yüksek pellet çaplarında dönüşüm azalması kütle aktarım kısıtlamalarına bağlanmıştır.

Ortam pH 'ının, enzimlerin iyonlaşabilen grupları üzerinde önemli bir etkisi olduğu için enzim aktivitesindeki rolü büyüktür. Aktif merkezin konformasyonunu koruyup işlevini yerine getirebilmesi için bu grupların iyonik formda olması gerekir. pH substrattaki iyonlaşabilen grupları etkileyebilmektedir. Tutuklama çalışmalarında optimum pH 'ın değişimi enzimin yüküne veya kullanılan matrikse bağlıdır. Bu değişim, enzimin yapı - fonksiyon ilişkisinin anlaşılmasında yardımcı olur. Alginat jelinde tutuklama işlemi için fosfat tamponunda optimum pH değeri tutuklanmış taze ve liyofilize havuç içinde 7.0 olarak bulunmuştur.

Tutuklanmış taze havuç ile biyoindirgenme deneylerinde tris tamponunda pH etkisi incelenirken, 2 mM (0.24 g/L) başlangıç substrat derişiminde, en yüksek dönüşüm % 64 ve % >99 ee değeri pH=7.6 da 24 h sonunda elde edilmiştir. Tutuklanmış taze havuç ile biyoindirgenme deneylerinde fosfat tamponunda ise 2 mM (0.24 g/L) başlangıç substrat derişiminde, aynı dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerine yaklaşık 48 h sonunda ulaşılmıştır.

Tutuklama işleminin Tris tamponunda reaksiyon süresini kısalttığı gözlenmiştir. Bu nedenle, tutuklanmış taze havuç hücreleri ile sürekli sistemde, özellikle pH 7.5'in üzerinde fosfat tamponuna göre daha stabil oluşu ve kalsiyum tuzlarını çöktürmemesi nedeni ile tampon ortamı olarak tris tamponu kullanılmıştır.

Bütün kimyasal tepkimeler gibi enzimatik tepkimelerde de tepkime hızı sıcaklık ile artar, ancak yüksek sıcaklıklarda enzim yapısında meydana gelen denatürasyon nedeniyle enzimin aktif merkezi aktifliğini yitirerek düşüş gözlenir. Taze ve liyofilize havuç hücreleri ile gerçekleştirilen tutuklama işleminin bu denatürasyonu azaltması beklenirken bu çalışmada serbest hücreler ile çalışılan optimum sıcaklığı değiştirmemiştir.

Serbest hücre çalışmalarında hücrelerin bir kısmı da çözeltide bulunduğu için yeniden kullanılması saflaştırma işlemleri gerektirir. Bu nedenle sadece bir kez kullanılabilir. Tutuklanmış enzimlerin tekrar tekrar kullanılabilmesi serbest enzimlere göre üstünlükleridir. 2 mM (0.24 g/L) başlangıç substrat derişiminde, tutuklanmış taze havuç hücrelerinin ilk kullanımda % 66 olan dönüşüm değerinin 5 kez kullanımından sonra % 62 değerine düştüğü fakat aktivitesini yaklaşık % 90 oranında koruduğu gözlenmiştir.

Tutuklanmış enzimler, serbest çözünen enzimlerde olmayan yeni bir probleme neden olabilir. Bu problemler, büyük partikül büyüklüğündeki enzimlerden kaynaklanan kütle aktarım dirençleridir. Tutuklanmış enzim, partikül yüzeyine tutuklanmış ve sadece sıvı yığından reaksiyonun gerçekleştiği partikül yüzeyine kütle aktarımı söz konusu ise dış kütle aktarımı gerçekleşir.

Enzimler polimerizasyon veya mikroenkapsülasyon ile tutuklanıyorsa, partikül içi kütle aktarım dirençleri, enzimatik reaksiyonun hızını etkileyebilir. Partikül içi kütle aktarım dirençleri analizi, substratın agaroz, agar veya jelatin gibi tutuklama matrislerindeki etkin difüzyonunun bilinmesini gerektirir.

Asetofenonun aljinat jelindeki etkin difüzyon katsayısına literatürde (% 1.5 w/w) 3.24×10^{-6} cm²/s olarak rastlanmıştır (Wu vd.. 1994). Bu çalışmada (% 2 w/w) aljinat jelinde ortalama 1.96×10^{-6} cm²/s olarak bulunmuştur. Jel içindeki difüzyonun

güçleşmesi nedeniyle difüzyon katsayısının azalması beklenen bir sonuçtur (Mota vd.. 2001).

Asetofenonun sudaki diffüsitivitesi $9.21 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 'dir (Bird 1960). Beklenildiği gibi, asetofenonun farklı tutuklama matrislerindeki difüsitivitesi, sudakinden küçüktür

Çalışmada yapılan reaksiyon kinetiği çalışmalarında öncelikle substrat inhibisyon kinetiği Lineweaver-Burk grafikleri kullanılarak incelenmiş daha sonra her bir biyokatalizör için (taze havuç, liyofilize havuç ve tutuklanmış taze havuç hücreleri) Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak K_M ve r_{maks} kinetik sabitleri belirlenmiştir.

Çizelge 5.1 Taze ve liyofilize havuç için K_M ve r_{maks} değerleri

Biyokatalizör	K_M	r_{maks}
Taze havuç	2.31	0.052
Liyofilize havuç	3.10	0.092

Michaelis-Menten denkleminde göre; K_M (Michaelis-Menten sabiti), enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermektedir. K_M değeri küçük olan enzim, substratı için yüksek bir affinite gösterir; enzim düşük bir substrat derişiminde doyararak maksimum hız sağlar. K_M değeri büyük olan enzim, substratı için düşük bir affinite gösterir; enzimin yarı doygunluğa ulaşması için daha fazla substrat derişimi gerekmektedir. Bir enzim için K_M değeri, enzim ile verilen substratın karşılıklı etkileşimini karakterize eden bir sabit sayıdır.

K_M değeri, 3-10 mM ve daha düşük olan enzimler yüksek afiniteli enzimlerdir. Burada taze havuç için $K_M=2.31 \text{ mM}$ ' dir. ADH enzimi kaynağı olarak seçilen *D.Carota* (taze havuç), asetofenona ilgisi K_M değeri gözönüne alındığında yüksek olduğu görülmektedir.

Liyofilize havuç biyokatalizörü için enzimin substratına karşı olan ilgisini belirten K_M (3.10) değeri, taze havuç biyokatalizörüne (2.31) göre daha yüksek bir değere sahiptir. Liyofilizasyon işlemi enzimin affinitesini olumsuz etkilemiştir.

Tutuklanmış taze havuç için yapılan kinetik çalışmalarında ise Michaelis-Menten sabitleri aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 5.2 Serbest ve tutuklanmış hücreler için toplu sonuçlar

	K_M (mmol/L)	r_{maks} (mmol/Ldak)
Serbest hücre	2.3142	0.0515
Tutuklanmış hücre	$K_{Mgöz}$ (mmol/L)	$r_{maksgöz}$ (mmol/Ldak)
Dp1= 2 mm	3.0472	0.0407
Dp2= 3 mm	4.9383	0.0453

K_M değişimi enzim yapısındaki konformasyonundaki değişimden çok difüzyon kısıtlamalarına bağlıdır. Başka bir deyişle K_M kinetik sabiti enzim ile substrat arasındaki ES kompleksinin sağlamlık ölçüsüdür. Bu değer küçüldükçe enzimin iyonlaşma riski o kadar azalır. Serbest ve tutuklu enzime ait bu değerler karşılaştırıldığında ADH enziminin tutuklama ile K_M değerinin serbest enzime göre difüzyon sınırlamaları nedeniyle arttığı ve böylece enzimin substratına olan ilgisinin azaldığı görülmektedir. Diğer bir kinetik sabit olan r_{maks} ise enzimin aktifliğinin bir ölçüsüdür. Burada r_{maks} değeri serbest hücreye göre azalmıştır. Bu durum enzimin aktif merkezinin tutuklama işleminden etkilendiğini göstermektedir.

Çalışmada, katalizör partiküllerde difüzyon ve reaksiyon olaylarını incelemek için Thiele modülü ve substratın katalizör içine ne kadar difüzlendiğinin bir ölçüsü olan etkinlik katsayısı değerleri belirlenmiştir.

Çizelge 5.3 Pellet çapı, etkinlik katsayısı ve Thiele modülü toplu sonuçlar

Pellet çapı	Etkinlik katsayısı	Thiele modülü
Dp1= 2 mm	$\eta_1=0.6764$	$\Phi_1=4.6$
Dp2= 3 mm	$\eta_2=0.5462$	$\Phi_2=8.2$

Çizelge 5.3’de görüldüğü üzere, partikül büyüklüğünün artması ile Thiele modülü artmış, etkinlik katsayısı ise azalmıştır.

Bu durum parçacık içindeki difüzyonunun çok yavaş olduğunu, substratın difüzyon kısıtlaması sonucu katalizörün iç bölümlerine ulaşmadan tepkimeye girdiğini, katalizör taneciğinin sadece küçük bir bölümünün etkin olarak kullanılabildiğini göstermektedir.

Tanecik çapı büyüdükçe etkinlik katsayısının daha da küçülmesi, difüzyon kısıtlamalarından dolayı beklenen bir sonuçtur.

Bu çalışma kapsamında liyofilize havuç kullanılarak gerçekleştirilen biyoindirgenme tepkimelerinde optimum koşulların belirlenmesi amacıyla cevap yüzey yöntemi ile optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiş ve elde edilen model denklem aynı program kullanılarak çözülmüştür. Serbest hücrelerle, kesikli sistemde 0.96 mM başlangıç asetofenon derişiminde optimum koşullarda ($t= 51.68$ h, $C_{bl}= 24.95$ g/L, $N= 199.82$ rpm) 0.578 mM (S)-1-feniletanol elde edilmiştir.

Asetofenonun tutuklanmış taze havuç biyokatalizörleri ile enantiyoseçimli biyoindirgenme tepkimesinin sürekli sistemde uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla dolgulu kolon biyoreaktörde sabit substrat ve biyokatalizör derişiminde farklı akış hızlarında zamanla substrat dönüşümü izlenmiştir.

Literatürde sürekli sistemde bitki biyokatalizörleri ile asimetrik biyoindirgeme üzerine çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma literatürdeki bu boşluğu doldurmak amaçlı önemli bir yere sahiptir.

Çalışmada dolgulu kolon kullanılmıştır. Dolgulu kolonun performansını etkileyen parametreler partikül büyüklüğü, akış hızı, alıkonma süresi gibi parametrelerdir. Her bir parametrenin optimizasyonu yapılarak kolonun verimi arttırılabilmektedir.

Kolon verimini arttırmak için küçük partiküllerle çalışılmalıdır. Bununla beraber partikül büyüklüğü azaldıkça dolgulu kolonda basınç düşmesi artacağından tepkime hız verileri elde edilirken kütle transferinin tepkimeyi sınırlamadığı akış hızına

yükseltilmelidir (Fogler 1999). Bu amaçla, 2mm çapında tutuklanmış taze havuç hücreleri ile en düşük partikül çapında çalışılmıştır. Partikül çapının küçülmesiyle kolon içine yerleştirilen partikül sayısının artarak buna bağlı olarak, enzimin tutuklandığı yüzey alanın da artması önemli bir etkidir.

Dolgulu kolon performansını etkileyen bir diğer parametrede akış hızıdır. Akış hızının artması ile dönüşüm hızı artmış ve daha yüksek akış hızlarında azalmıştır. Akış hızının artması ile partikül yüzeyindeki kütle aktarım dirençlerinin azalmış ve enzim substrat etkileşiminin verimliliği artmıştır (Cho vd. 1978).

Düşük akış hızlarında tanecikler etrafındaki film tabakası direnci kırılmadığından tepkime hızları da düşüktür. Yüksek besleme akış hızlarına çıkıldığında ise alıkonma süresi çok azaldığı için tepkime hızında bir azalma gözlenmiştir. Bunun nedeni hızlı akış hızlarında alıkonma süresinin düşük olmasından dolayı enzimle substrat arasında yeterli etkileşimin gerçekleşmemesidir.

Yüksek dönüşüm değerlerine ulaşmak için film dirençlerinin yüksek hızlarda çalışılarak minimum düzeyde tutulabilmesi gerekir fakat bu sistem için 4 mL/h değerinin üzerine çıkılmamalıdır.

Küçük partiküller daha yüksek etkinlik katsayısına ve daha düşük Thiele modülüne sahiptir. Bu özellikleri taşıyan partikülün kolon içerisinde daha yüksek verimle çalışması yani dönüşüm oranının yüksek olması beklenen bir sonuçtur.

Sürekli sistemde yapılan deneylerde akış hızlarına bağlı olarak 2- 4 ve 7 saat kalma sürelerinde çalışılmış ve en yüksek dönüşüme, 2 mM (0.24 g/L) başlangıç substrat derişiminde, (% 75) 4 h'lik kalma süresinde ulaşılmıştır.

Alıkonma süresi arttıkça, yatışkın koşula gelme süresi de artmıştır. Düşük akış hızlarında 12-17 saatte, yüksek akış hızında ise daha kısa sürede (8 saat) yatışkın koşula ulaşılmıştır.

Sürekli sistemde başlangıç substrat derişimi etkisi, 1 mM, 2 mM ve 4 mM olan besleme çözeltilerinin 4 h olarak belirlenen alıkonma süresinde reaktörden geçirilmesiyle incelenmiştir. Substrat derişimi 2 mM (0.24 g/L) için % 75 dönüşüm, 4 mM (0.48 g/L) için % 47 dönüşüm olarak elde edilmiştir. Substrat derişiminin artması, substrat inhibisyonundan dolayı dönüşümü olumsuz yönde etkilemiştir.

Kimyasal proses problemlerinin modern anlamda analizi, genellikle bir takım matematiksel modeller gerektirir. Çalışmada son olarak, sistemin matematik modeli oluşturulmuştur.

Bu amaçla, dolgulu kolon biyoreaktörde, Re sayısı hesabı, boş ve dolu kolon hızları hesaplanarak, dolgulu kolon biyoreaktörün modeli, MATLAB paket programı kullanılarak çözülmüştür. Sonuçlar deneysel verilerle karşılaştırılmıştır. Sonuçların uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Literatürde sürekli sistemde bitki hücreleri biyokatalizörlüğünde biyoindirgenme tepkimelerine ait bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle literatür karşılaştırmaları yapılamamıştır.

KAYNAKLAR

- Acar, D.Ö. 2009. Üreaz enziminin Ca-alginat üzerine immobilizasyon koşullarının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Ager, J.D. and East, B.M. 1995. Asymmetric Synthetic Methodology. CRC Press.
- Aıtken, R.A. and Kilenyi, S.N. 1995. Asymmetric Synthesis. Blackie Academic and Professional, London.
- Aksu, Z. and Gönen, F. 2006. Binary biosorption of phenol and chromium(VI) onto immobilized activated sludge in a packed bed: Prediction of kinetic parameters and breakthrough curves, Separation and Purification Technol., 49(3); 205-216.
- Aleksey, Z. and Dodds, D.R. 1997. Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. Elsevier 2(12); 513-531.
- Anonymous. 2014. Web Sitesi: <http://www.pharma-solutions.basf.com>, Erişim Tarihi: 18.02.2014.
- Anonymous. 2014. Web Sitesi: <http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudoephedrine>, Erişim Tarihi: 18.02.2014.
- Anonymous. 2014. Web Sitesi: http://www.mustafaaltınışik.org.uk/89_1_01.pdf, Erişim Tarihi: 31.03.2014.
- Anonymous. 2014. Web Sitesi: <http://w.anadolu.edu.tr/aos/kitap/ioltp/2282/unite03>, Erişim Tarihi: 29.02.2014.
- Anonymous. 2014. Web Sitesi: <http://www.mu.edu.tr/departmens/biyoloji>, Erişim Tarihi: 27.03.2014
- Araujo, P.W. and Brereton, R.G. 1996. Experimental design I. Screening, T. Trends in Analytical Chemistry, 15(1); 26–31.
- Atkins, R.C. and Carey, F.A. 1999. Organic Chemistry. The McGraw-Hill companies, Inc, 184–212, New York.
- Aydoğan, Ö. 2012. Ketonların Biyokatalitik İndirgenmesi ile Enantiyomerik Safılıkta Kiral Madde Üretimi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Bezerra, M.A., Santelli, R.E, Oliveira, E.P., Villar, L.S. and Escaleira, L.A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a too for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5); 965-977.
- Bird, R.B., Stewart, W.E. and Lightfoot, E.N. 1960. *Transport phenomena*. Wiley, New York.
- Box, G.E. and Hanter, G.J. 1980. *Statistics for Experimenters*, John Willey and Sons, New York.
- Bradley, N. 2007. *The response surface methodology*. Master Thesis, Indiana University South Bend, Department of Mathematical Sciences, Applied Mathematics and Computer Science.
- Carley, K.M., Kamneva, N.Y. and Reminga, J. 2004. Response surface methodology. CASOS Technical Report, Carnegie Mellon University, 4-136.
- Chaplin, M.F. and Bucke, C. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge University, Cambridge.
- Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. and Wothers, P. 2000. *Organic Chemistry*. Oxford University Press, Oxford.
- Collins, N.A., Sheldrake, N.G. and Crosby, J. 1992. *Chirality in Industry*. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Cong, C., Chang, Y., Deng, J., Xiao, C. and Su, Z. 2001. A novel scale-up method for mammalian cell culture in packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*, 23, 881–885.
- Copeland, R.A. 2000. *Kinetics of single substrate enzyme reactions*. John Wiley & Sons Inc., 390 p.
- Cornish, A. 1999. *Fundamentals of enzyme kinetics*. Portland Pres Ltd, 343 p., London.
- Collins, N.A, Sheldrake, N.G. and Crosby, J. 1997. *Chirality in industry, developments in the manufacture and applications of optically active compounds*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Csuk, R. and Glanzer, B.I. 1990. Biocatalytical transformations II. Enantioselective hydrolysis of N-acetyl-fluoro-phenylalanine-ethylesters by lyophilised yeast. *Chem. Rev.*, 91, 49-97.
- Demirtas, H.N., Bozkurt, S., Durmaz, M., Yilmaz, M. and Sirit, A. 2009. Chiral calix[4]azacrowns for enantiomeric recognition of amino acid derivatives. *Tetrahedron*, 65, 3014–3018.

- Demirtaş H. 2009. Aminoasit ve aminlerin enantiyomerik tanınması için kiral reseptörlerin sentezi ve uygulamaları. Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Duran, A., Karakaya, M. ve Sarıçoban, C. 2002. Liyofilizasyon Uygulamasının Sığır ve Tavuk Etlerinin Bazı Emülsiyon Özellikleri Üzerine Etkisi. Standart, 75-80.
- Dutta, R. 2008. Fundamentals of Biochemical Engineering. Springer Berlin Heidelberg New York.
- Faber, K. 2000. Biotransformation in organic chemistry. Sprindler-Verlag, Germany.
- Faber, K. 2003. Biotransformations in Organic Chemistry. Springer-Verlag, Berlin, 1-407.
- Fogler, H.S. 1992. Elements of Chemical Reaction Engineering. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- Fraser, D. 1951. Bursting bacteria by release gas pressure. Nature. 167, 33-34.
- George, M. and Abraham, T.E. 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. Journal of Controlled Release, 114, 1-14.
- Gülsoy, N. 2000. Biyotransformasyon ile 3-metil bütanolde 3-metil bütirik asit üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ghanem, A. and Aboulenein, H. Y. 2004. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. Tetrahedron: Asymmetry Report Number 78(15); 3331-3351.
- Giri, A., Dhingra, V., Giri, C.C., Singh, A., Ward, O.P. and Narasu, M.L. 2001. Biotechnology Adv., 19; 175.
- Gong, R., Li, C., Zhu, S., Zhang, Y., Du, Y. and Jiang, J. 2011. A novel pH-sensitive hydrogel based on dual crosslinked alginate/N-a-glutaric acid chitosan for oral delivery of protein. Carbohydrate Polymers, 85; 869-874.
- Gruber, C.C., Lavendera, I., Kroutil, W. and Faber, K. 2006. From a racemate to a single enantiomer: Deracemization by stereoinversion. Adv. Syn. Catal., 348; 1789-1805.

- Hummel, W., Abokitse, K., Drauz, K., Rollmann, C. and Gröger, H. 2003. Towards a Large-Scale Asymmetric Reduction Process with Isolated Enzymes: Expression of an (S)-Alcohol Dehydrogenase in *E. coli* and Studies on the Synthetic Potential of this Biocatalyst. *Adv. Synth. Catal.*, 345; 153-159.
- Hussain W, P. D., Truppo, M and Lye, G. 2008. Enzymatic ketone reductions with co-factor recycling: Improved reactions with ionic liquid co-solvents. *J Mol Catal B: Enzym* 55; 19-29.
- Irzyniec, Z., Klimczak, J. and Michalowski, S. 1995. Freeze-drying of de black currant juice. *Drying Technology*, 13(12); 417-424.
- Jacques, S. and Nair, M.S. 1981. Studies on the enzymatic kinetic resolution of beta-hydroxy ketones, *J.Mol. Cat. B: Enzymatic*, 22; 152-160.
- Ji-Hua, L. and Bo-Yang, Y. 2010. Biotransformation of bioactive natural products for pharmaceutical Lead compounds. *Curr Org Chem*, 14; 1400–6.
- Kennedy, J.F. 1995. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ellis Horwood, 235-310.
- Kieslich, K. 1984. *Biotechnology*. Verlag chemie, 1-32, Germany.
- Krokida, M.K., Karathanos, V.T. and Maroulis, Z.B. 1998. Effect of Freeze-drying Conditions on Shrinkage and Porosity of Dehydrated. *International Journal of Food Science and Technology*, 35; 369-380.
- Koshcheyenko, K.A. and Sukhodolskaya, G.V. 1985. *Immobilised cells: transformation off steroids in immobilised cells and enzymes*. IRL Press, Oxford, 91-225.
- Krajewska, B. 2003. Applicaiton of Chitin and Chitosan Based Materials for Enzyme Immobilization: a Review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35; 126-139.
- Leandro, H. A., Roberto, S.U., Alvaro, T.O., Andre, L.M.P and Joao, V.C. 2005. Edible catalysts for clean chemical: Bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38; 84-90.
- Liapis, A.I. and Bruttini, R. 1994. A theory for the primary and secondary drying stages of the freeze-drying of pharmaceutical crystalline and amorphous solutes: Comparison between experimental data and theory. *Separations Technology*, 4; 144-155.

- Ludmil, B. and Jameela, A. 2002. Disrupting *Escherichia coli*: A Comparison of Method. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4); 428-431.
- Mehmetoğlu, Ü., 1990. Effective diffusion coefficient of sucrose in calcium alginate gel. *Enzyme Microb. Technol.*, 12; 124-126.
- Meryman, H.T. 1960. Principles of freeze-drying. *Annals of the New Academy of Sciences*, 85; 630-640.
- Montgomery, D.C. 2009. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, Inc., Asia.
- Myers, R.H. and Montgomery, D.D. 1995. Response surface Methodology: Process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons, Inc., New York, 700p.
- Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T. and Harada, T. 2003. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron Asymmetry*, 14; 2659-2681.
- Noyori, R. 1990. Chiral metal complexes as discriminating molecular catalyst. *Science*, 248; 1194.
- Ong, A.L., Kamaruddin, A.H., Bhatia, S., Long, W.S., Lim, S.T. and Kumari, R. 2006. Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-ketoprofen. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4); 924-929
- Özkara, T. 2003. Dondurarak Kurutma Yöntemi İle Saklanan Greftlerin Mekanik Özellikleri Üzerine Radyasyonla Sterilizasyonun Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Perry, V.P. 1976. Freeze-drying for the preservation of human tissues. *Transplant P.*, 2; 189-193.
- Peschko, C. 2005. Enzymatic method for the enantioselective reduction of keto compounds. EP Patent 1568780.
- Pessela, B.C.C., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., Garcia, J.L., Carrascosa, A.V., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R. 2003. The immobilization of thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition Complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme and Microbial Technology*, 33; 199-205.
- Pfaller, R. 2007. Production of (S)-2-Butanol by oxidative racemate resolution. US Patent 0207529.

- Porter, W.H. 1991. Resolution of chiral drugs. *Pure Appl Chem.*, 63; 1119-1122.
- Rajaguru, P., Kalaiselvi, K. and Subburam, V. 1995. Biodegradation of azodyes in sequential anaerobic-aerobic system. *Appl. Mic. Biotech.*, 54; 268-273.
- Ramsay, O.B. 1981. *Stereochemistry*. John Wiley & Sons Ltd., Heyden, London.
- Raymond, H.M. 1971. *Response Surface Methodology*. Boston.
- Sadikoglu, H., Ozdemir, M. and Seker, M. 2003. Optimal Control of the Primary Drying Stage of Freeze Drying of Solutions in Vials Using Variational Calculus. *Drying Technology*, 21 (7); 1307-1331.
- Sadikoglu, H. 2005. Optimal Control of the Secondary Drying Stage of Freeze Drying of Solutions in Vials Using Variational Calculus. *Drying Technology*, 23; 33-57.
- Sheehan, P. and Liapis, A.I. 1998. Modeling of the primary and secondary drying stages of the freeze drying of pharmaceutical products in vials: Numerical results obtained from the solution of a dynamic and spatially multi-dimensional lyophilization model for different operational policies, *Biotechnology and Bioengineering*, 60 (6); 712-728.
- Shijie, L. 2013. Enzymes. *Bioprocess Engineering*, 323–390 p.
- Shuler, M.L. and Kargi, F. 1992. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. Prentice Hall.
- Sinnott, R. K. 2009. *Chemical Engineering Design*. 664-665 p.
- Skauen, D. 1976. A comparison of heat production and cavitation intensity in several ultrasonic cell disrupters. *Ultrasonics* 14; 173-176.
- Solomons, G. and Fryhle, C. 2000. *Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc, 184-210, New York.
- Stampfer W., Kosjek, B., Moitzi, C., Kroutil, W. and Faber, K. 2002. Biocatalytic Asymmetric Hydrogen Transfer. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41;1014–1017.
- Suan, C. and Mohamad, R.S. 2004. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. Department of Bioprocess Engineering, Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering, University Teknologi Malaysia.
- Telefoncu, A. 1995. *Biyoteknoloji*. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.
- Tiryaki, Ö. İ. 1993. *Endüstriyel Proseslerde Biyokatalizör Pelletlerin Kullanımı*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Tschaen D.M., Cai, D., Desmond, R., Dolling, U.H., Frey, L., Karady, S., Shi, Y.J. and Verhoeven, T.R. 1995. Asymmetric synthesis of MK-0499. *J Org Chem* 60; 4324-4330.
- Twyman, R.M. 2005. Immobilized Enzymes. *Encyclopedia of Analytical Science*, 523-529 p.
- Uzura, A., Katsuragi, T. and Tani, Y. 2001. Optimal conditions for production of (R)-1-phenylpropanol by *Fusarium moniliforme* Strain MS 31. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(3), 288-293.
- Ürküt, Z., Dağbağlı, S. and Göksungur, Y. 2007. Optimization of pullulan production using Ca-alginate- immobilized *Aureobasidium pullulans* by response surface methodology. *Chem Technol Biotechnol* 82; 837–846.
- Vieira, S. and Hoffman, R. 1989. *Estatistica Experimental. Atlas*, São Paulo.
- Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M. and Sikkema, J. 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20; 292-302.
- Yadav, J.S., Basi, V.S.R., Cihittamuru, S. and Adari B.R. 2009. Enantioselective reduction of prochiral ketones employing sprouted *Pisum Sativa* as biocatalyst. *Synthesis*, 11; 1881-1885.
- Wanda, K.M. and Agnieszka, M. 2004. Enantioselective reduction of bromo- and methoxy acetophenone derivatives using carrot and celeriac enzymatic system. *Tetrahedron: Asymmetry* 15; 1965–1967.
- Wang, S.J. and Zhong, J.J. 2007. *Bioreactor Engineering*. Elsevier B.V., 134-136.
- Wanga, S.J. and Zhonga, J.J. 2007. *Bioreactor Engineering*. Elsevier B.V., 131-164, China.
- Whitford, D. 2005. *Proteins: structure and function*, John Wiley & Sons Ltd, USA.
- Wilén, S.H., Collet, A. and Jacques, J. 1977. Strategies in Optical Resolutions. *Tetrahedron*, 33; 2734.
- Wolfgang, K. and Aashrita, R. 2011. *Biocatalytic reactions: selected highlights*. Department of Chemistry, Organic and Bioorganic Chemistry, University of Graz, Austria.
- Wong, C. and Whitesides, G.M. 1995. *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Elsevier Science Ltd., London.

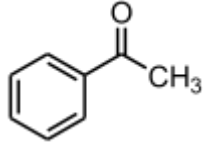
- Wong, T.W., Chan, L.W., Kho, S.B. and Heng, P.W.S. 2002. Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave. *Journal of Controlled Release*, 84; 99–114.
- Zhang, H.M., Xiao, J.N., Cheng, Y.J., Liu, L.F., Zhang, X.W. and Yang., F.L. 2006. Comparison between a sequencing batch membrane bioreactor and conventional membrane bioreactor. *Process Biochemistry*, 41; 87-95.

EKLER

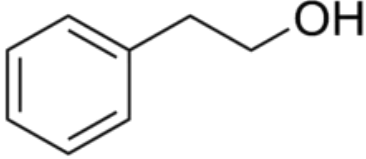
- EK 1 Asetofenon ve (R,S)-1-feniletanol'e Ait Fiziksel Özellikler
- EK 2 Asetofenon ve (R,S)-1-feniletanol'e Ait Kalibrasyon Grafiği
- EK 3 Asetofenon, (R)-1-feniletanol ve (S)-1-feniletanol'e Ait HPLC Kromatogramı
- EK 4 Enzim Aktivitesi Ölçme
- EK 5 Gerçek ve Gözlenen Michaelis-Menten Sabitlerinin Hesaplanması
- EK 6 Etkinlik Faktörü, Gözlenen Thiele Modülü ve Etkin Difüzyon Katsayısı Hesaplanması
- EK 7 Reynolds Sayısı Hesabı
- EK 8 Dolgulu Kolon Biyoreaktörün Model Çözümü (Matlab Çözümü)

EK 1 Asetofenon ve (R,S)-1-feniletanol'e Ait Fiziksel Özellikler

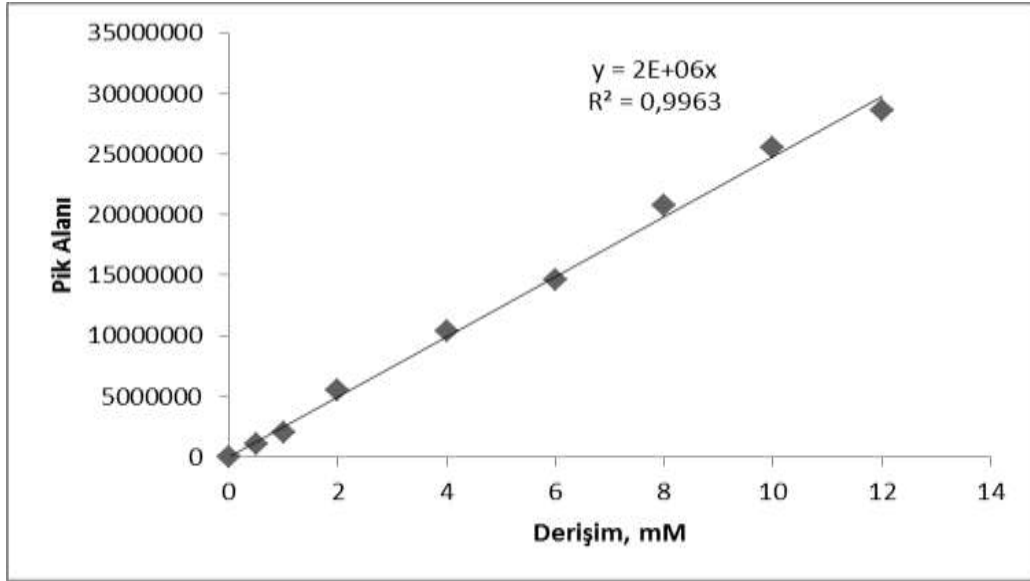
Çizelge 1 Asetofenona ait fiziksel özellikler (Clayden 2000)

ASETOFENON	
1-Fenil Etanon Fenil Metil Keton Asetilbenzen C_8H_8O / $C_6H_5COCH_3$ Moleküler Ağırlığı: 120.1 g/mol Kaynama Noktası: 202 °C Erime noktası: 20 °C Rölatif yoğunluk (su = 1): 1.03 Suda çözünürlüğü: zayıf Buhar basıncı, kPa 15°C de: 0.133 Renksiz sıvı veya beyaz kristal, karakteristik kokulu	

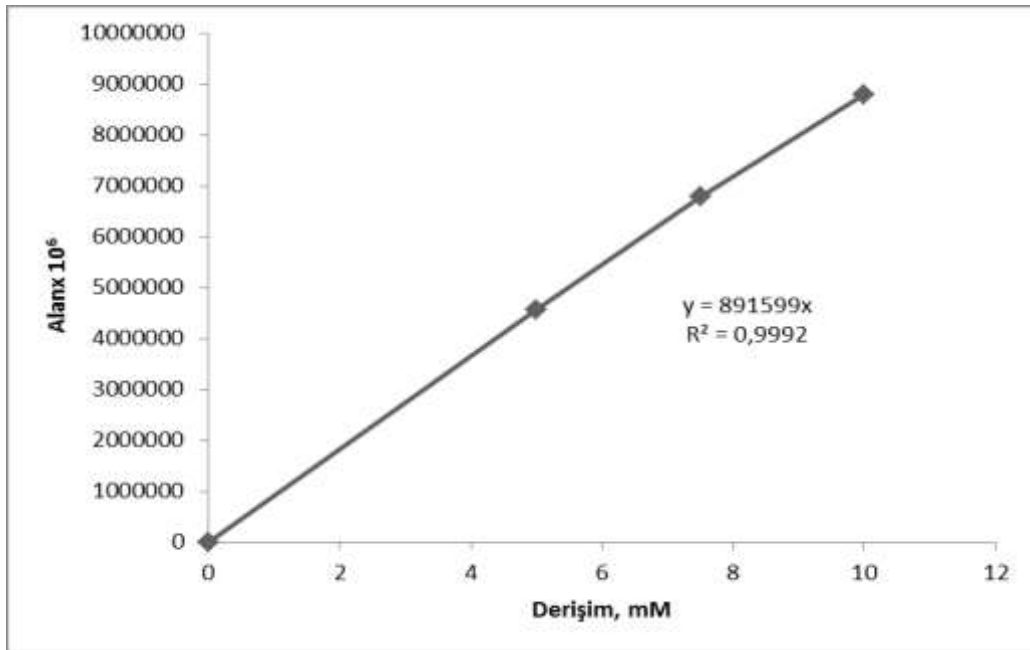
Çizelge 2 (R,S)-1-feniletanol'e ait fiziksel özellikler (Clayden 2000)

FENİL ETANOL	
<p>β-hydroxyethylbenzene. β-feniletanol, β-PEA. Bencilcarbinol $C_8H_{10}O$ Moleküler Ağırlığı: 122,16 g / mol Kaynama noktası: 225°C Erime noktası: -27 ° C (246 K) Yoğunluk: 1017-1020 (25) gr / cm 3 Görünüşü: Renksiz yağlı bir sıvı</p>	

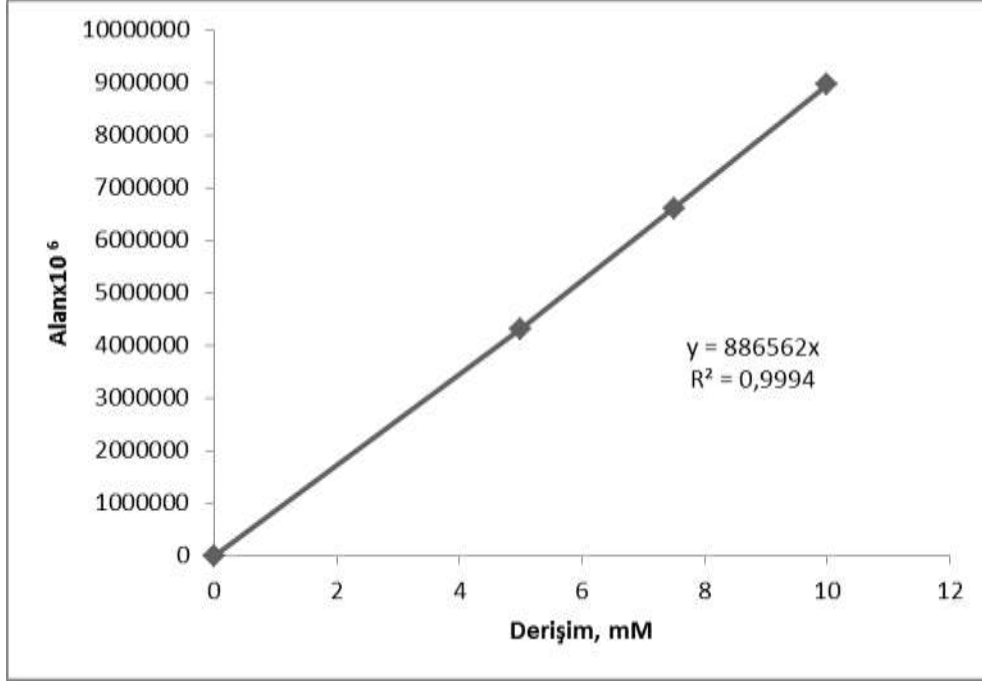
EK 2 Asetofenon ve (R,S)-1-feniletanol'e Ait Kalibrasyon Grafikleri



Şekil 1 Asetofenon'a ait kalibrasyon grafiği, 254 nm

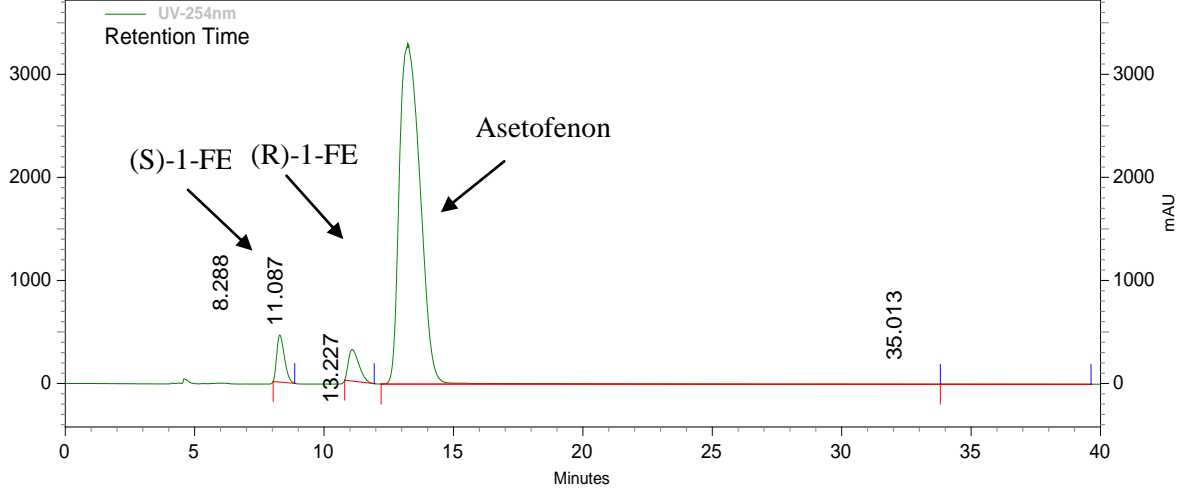


Şekil 2 (S)-1-feniletanol'e ait kalibrasyon grafiği, 254 nm



Şekil 3 (R)-1-feniletanol'e ait kalibrasyon grafiği, 254 nm

EK 3 Asetofenon, (R)-1-feniletanol ve (S)-1-feniletanol'e Ait HPLC Kromatogramı



Şekil 1 Asetofenon, (R)-1-feniletanol ve (S)-1-feniletanol'e kromatogram

Asetofenon kalma süresi 13-15 dk olarak belirlenmiştir.

(S)-1-feniletanol kalma süresi 8-10 dk olarak belirlenmiştir.

(R)-1-feniletanol kalma süresi 11-12 dk olarak belirlenmiştir.

EK 4 Enzim Aktivitesi Ölçme

$$\text{Aktivite U/L} = \Delta\text{Abs/dak} \times (V_T \times 1000) / (\epsilon \times V_0 \times b)$$

$\Delta\text{Abs/dak}$: Absorbanstaki net artış

V_T : Toplam hacim, mL

V_0 : Örnek hacmi, mL

ϵ : 340 nm'de β -NADH için absorpsiyon sabiti ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Hummel vd.. 2003)

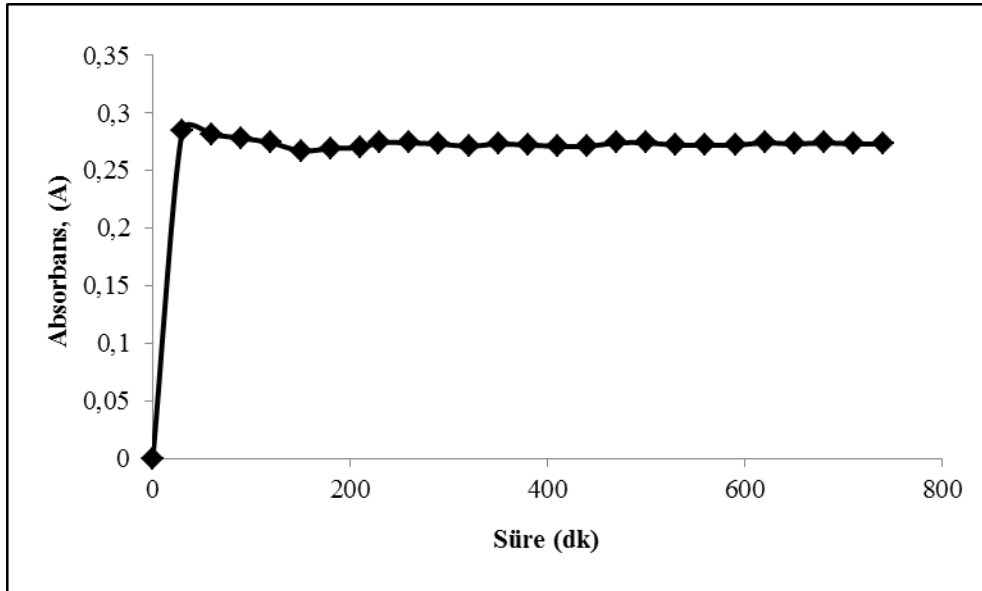
b : Küvet ışık yolu uzunluğu (1 cm)

Havuçta ADH aktivitesi:

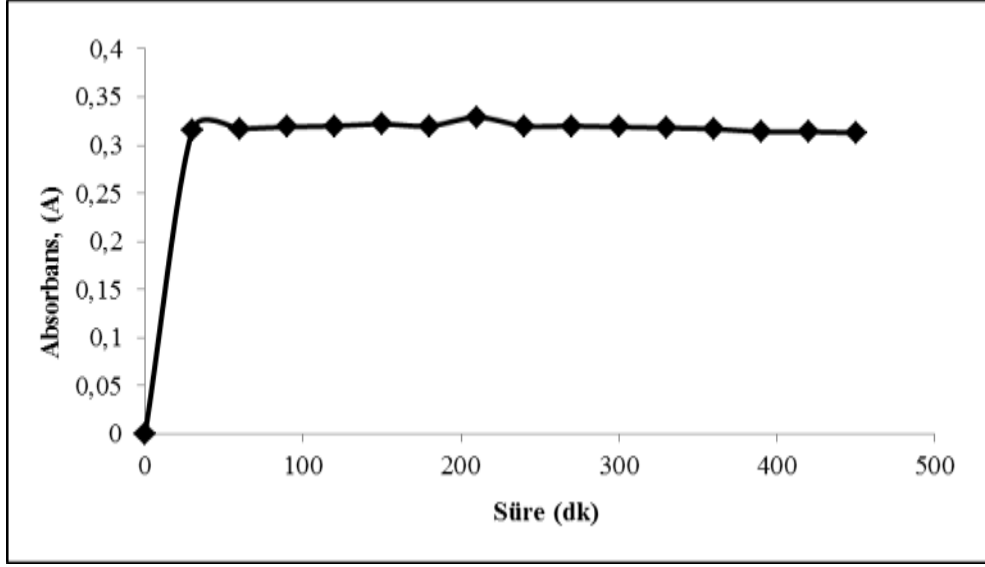
$$\Delta\text{Abs/dak (340 nm)} = 0.008$$

$$\text{Aktivite U/L} = \Delta\text{Abs/dak} \times (V_T \times 1000) / (\epsilon \times V_0 \times b)$$

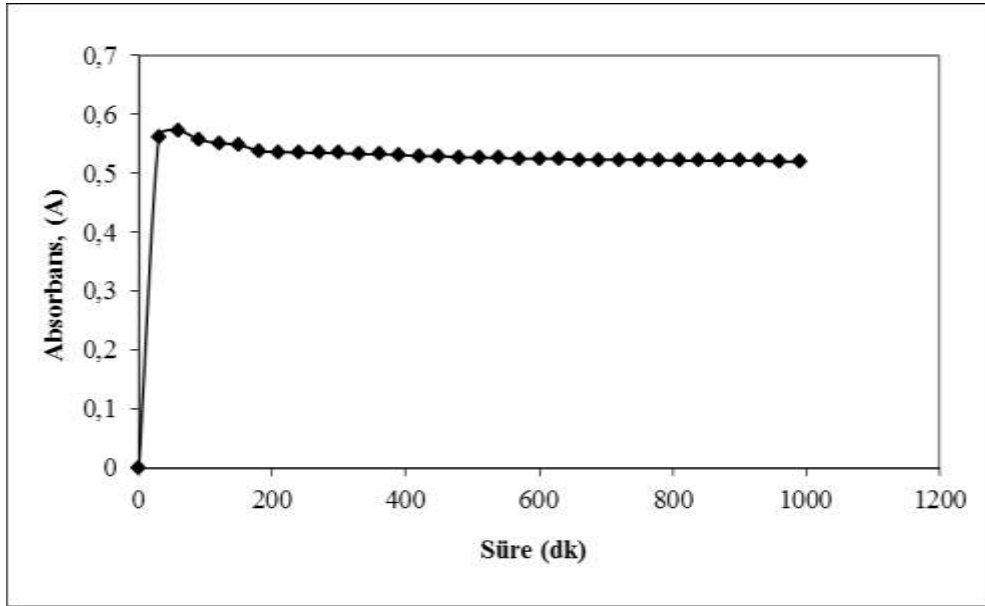
$$= 0.008 (2.5 \text{ mL}/0.2 \text{ mL}) \times 1000 / 6.22 = 16 \text{ U/L}$$



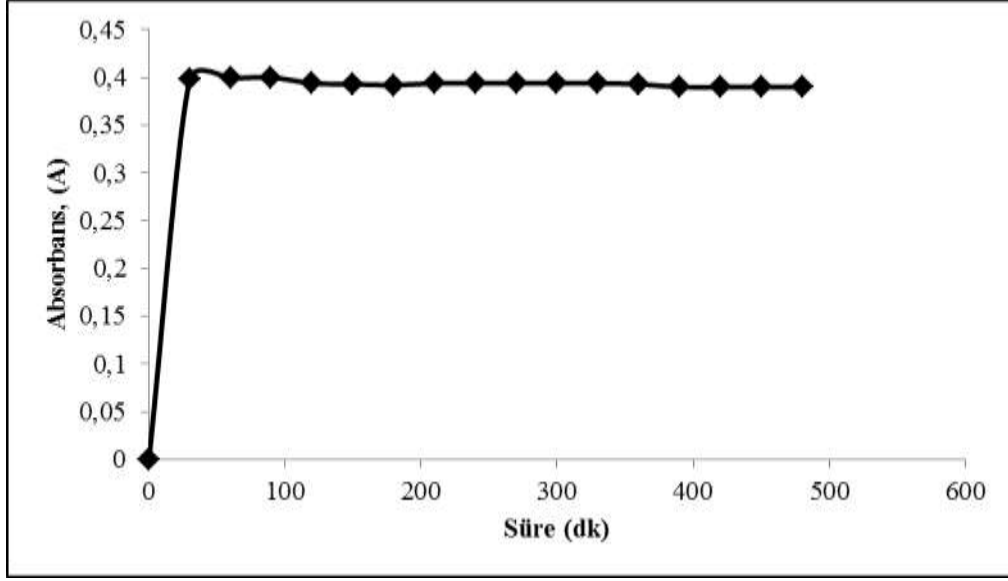
Şekil 1 Liyofilize havuç biyokatalizörü ile zamana karşı absorbans değişimi



Şeki 2 *Solanum tuberosum* (Patates) biyokatalizörü ile zamana karşı absorbans değışimi



Şekil 3 *Raphanus sativus* (Turp) biyokatalizörü ile zamana karşı absorbans değışimi



Şekil 4 *Vitaceae* (Üzüm) biyokatalizörü ile zamana karşı absorbans değişimi

EK 5 Gerçek ve Gözlenen Michaelis-Menten Sabitlerinin Hesaplanması

Serbest hücre için: $y=44.936x+19.406$

Kayma= $1/ r_{maks}$; $r_{maks} =0.0515$ mmol/Lh

Eğim= K_M/ r_{maks} ; $K_M = 2.3142$ mmol/L

Tutuklanmış taze havuç (2 mm çaplı): $y=74.737x+24.526$

Kayma= $1/ r_{maks}$; $r_{maks} =0.0407$ mmol/Lh

Eğim= K_M/ r_{maks} ; $K_M =3.0472$ mmol/L

Tutuklanmış taze havuç (3 mm çaplı): $y=108.97x+22.066$

Kayma= $1/ r_{maks}$; $r_{maks} =0.0453$ mmol/Lh

Eğim= K_M/ r_{maks} ; $K_M = 4.9383$ mmol/L

EK 6 Etkinlik Faktörü, Gözlenen Thiele Modülü ve Etkin Difüzyon Katsayısı Hesaplanması

$$\eta_1 = \frac{r_{göz,1}}{r_{gerçek}} \quad \eta_2 = \frac{r_{göz,2}}{r_{gerçek}} ; \quad r_{gerçek} = \frac{0.0515(\text{mmol} / \text{Lh}) C_S (\text{mM})}{2.31(\text{mmol} / \text{L}) + C_S (\text{mM})}$$

$$r_{göz,1} = \frac{0.0407(\text{mmol} / \text{Lh}) C_S (\text{mM})}{3.04(\text{mmol} / \text{L}) + C_S (\text{mM})} ; \quad r_{göz,2} = \frac{0.0453(\text{mmol} / \text{Lh}) C_S (\text{mM})}{4.938(\text{mmol} / \text{L}) + C_S (\text{mM})}$$

$C_S = 2 \text{ mM}$ için;

$$r_{gerçek} = 0,0238 \text{ mmol/Lh}, \quad r_{göz,1} = 0,0161 \text{ mmol/Lh}, \quad r_{göz,2} = 0,013 \text{ mmol/Lh}$$

$$\eta_1 = \frac{r_{göz,1}}{r_{gerçek}} = 0.6764 \quad ; \quad \eta_2 = \frac{r_{göz,2}}{r_{gerçek}} = 0.5462$$

Şekilden $\Phi_{göz,1} = 4.6$, $\Phi_{göz,2} = 8.2$

Gözlenen Thiele Modülü

$$\Phi_{göz} = \frac{r_{göz}}{De C_o} \left(\frac{R}{3} \right)^2 = 4.6; \quad De_1 = 1.949 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}; \quad De_2 = 1.981 \cdot 10^{-6}$$

EK 7 Reynolds Sayısı Hesabı

$$\text{Dolguolu kolonlar için: } Re = \frac{d_p \cdot U_o \cdot \rho}{\mu(1 - \varepsilon)}$$

d_p : tanecik çapı (m)

U_o : akışkanın kolon boşken hızı (m/s)

ρ : akışkanın yoğunluğu (kg/m³)

μ : akışkanın viskozitesi (kg/m*s)

ε : boşluk kesri

Akışkanın özellikleri olarak suyun özellikleri (T=306 K) alınmıştır.

$$\rho = 995.435 \text{ kg/m}^3$$

$$\mu = 0.758 \cdot 10^{-3} \text{ kg/m*s}$$

$$d_p = 2 \text{ mm} = 0.002 \text{ m}, D = 0.017 \text{ m}, L = 0.27 \text{ m}$$

$$Q = 4 \text{ mL/h} = 1.1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}$$

Boş kolon hızının (superficial hız) hesaplanması (U_o);

$$A = (\pi/4) D^2 = (\pi/4) (0.017)^2 = 2.26 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$$

$$U_o = Q/A = (1.1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3/\text{s}) / 2.27 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 = 0.48 \cdot 10^{-5} \text{ m/s}$$

Dolu kolon hızının (interstitial hız) hesaplanması (U);

$$\varepsilon = 0.33$$

$$U = U_o / \varepsilon = (0.48 \cdot 10^{-5}) / 0.33 = 1.468 \cdot 10^{-5} \text{ m/s}$$

$$Re = \frac{0.002 \cdot 0.48 \cdot 10^{-5} \cdot 995.435}{0.758 \cdot 10^{-3} \cdot (1 - 0.33)} = 0.02 \ll 10$$

$Re < 10$ ise, laminer koşul vardır.

EK 8 Dolgulu Kolon Biyoreaktörün Model Çözümü (Matlab Çözümü)

```
function dydx=model(x,y)
% x; biyoreaktör uzunluğu
% y; substrat derişimi
Dz=6.1e-007;
U=0.480e-005;
B=(U/Dz);
KM=3.0472;
rm=0.0006;% mmol/Lh
dydx=[y(2); B*y(1)+ (1/Dz) * [(rm*(y))/(KM+(y)) ]
[x y] = ode45(@model,[0 27],[2 0])
[x y]
plot(x,y(:,1));
xlabel('z, cm')
ylabel('Cso, mM')
```

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hilal ÇELİK KAZICI

Doğum Yeri : Van

Doğum Tarihi : 30.10.1981

Medeni Hali : Evli

Yabancı Diller : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kazım Karabekir Lisesi (1998)

Lisans : Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği
Bölümü (2003)

Yüksek Lisans : Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim
Dalı Bölümü (2007)

Çalıştığı Kurum

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü,
Araştırma Görevlisi, 2 Eylül 2012-...

Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimyasal
Teknolojiler Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi, 12 Eylül 2007- 2 Ağustos 2012

SCI Yayınlar

- **Celik, H.**, Gur, A., Demir, H., Yesilyurt, M. ve H. Ceylan, 2007. "An investigation on dissolution kinetics of pre-heated ulexite", Materials Science Research, 4, 57-63.
- Gür A., Yıldız A., **Çelik H.**, and Selcuk A., 2008. "Determination of the Optimum Conditions for Boric Acid Extraction from Ulexite in Perchloric Acid Solutions", A. Journal of Chemistry, 20, 2929-2936.

- **Çelik Kazıcı H.**, Mehmetoğlu Ü., 2014. “Enantiyomerik Saflıkta Sekonder Alkol Üretiminde Bitkilerin Biyokatalizör Olarak Kullanımı”, Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi,

Uluslararası Tebliğler

- **Celik Kazıcı H.**, Mehmetoğlu Ü., “Production of chiral pharmaceutical intermediates using vegetables as biocatalysts”, International Conference on Applied Bioscience and Biotechnology, 14-15 October, 2013, Barcelona, Spain.(Sözlü)

Ulusal Tebliğler

- **Celik, H.**, Gur, A., “Uleksitin perklorik asit çözeltilerindeki çözünme kinetiği”, XX. Ulusal Kimya Kongresi, 04-8 September, 2007, Kayseri.(Poster)
- **Celik, H.**, Gur, A.,” Uleksitin perklorik asit çözeltilerindeki kalsinasyonu”, XXI Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 August, 2007, Malatya.(Sunum)
- **Celik, H.**, Gur, A., “Uleksitten borik asit ekstraksiyonu için optimum koşulların belirlenmesi”, XXIII Ulusal Kimya Kongresi, 16-20 June, 2009, Sivas.(Poster)

Projeler

- “Asetofenonun bitki biyokatalizörlüğünde biyoindirgenmesi ile enantiyomerik saflıkta (S)-1-feniletanol üretimi”.Ankara Üniversitesi BAP (12B4343010), Araştırmacı, 2012-2014.