

**ORGANİK ÇÖZÜCÜ ORTAMLARINDA ENZİMLER
ARACILIĞIYLA YAPILAN SENTEZLERİN MODEL
SİSTEMLERDE İNCELENMESİ**

**AN INVESTIGATION OF ENZYMATIC SYNTHESIS IN
ORGANIC SOLVENT MEDIA USING MODEL SYSTEMS**

BURAK VELİ KABASAKAL

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2007

ORGANİK ÇÖZÜCÜ ORTAMLARINDA ENZİMLER ARACILIĞIYLA YAPILAN SENTEZLERİN MODEL SİSTEMLERDE İNCELENMESİ

Burak Veli KABASAKAL

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, genelde sulu ortamda yapılan biyokatalizlemenin organik çözücü ortamlarında kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Tutuklanmış bir lipaz olan Novozym 435 ile çalışılmıştır. Model substrat olarak bir trigliserit olan tribütirin seçilmiştir. Novozym 435 ile tribütirin hidrolizi ve tribütirinin transesterleşme ve interesterleşme tepkimeleri incelenmiştir.

Hidroliz kısmında, tribütirinin suda çözünür halde ve emülsiyon halinde hidrolizi incelenmiş, optimum pH, 7.0, optimum sıcaklık, 50 °C, optimum karıştırma hızı, 300 rpm, optimum enzim derişimi, 100 mg tutuklanmış enzim/30 mL tepkime hacmi olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi, tribütirinin hem çözünür halde hem de emülsiyon halinde olduğu durumda, Michaelis&Menten kinetiğine uygun davranış göstermiş, Michaelis&Menten parametreleri, V_m , 0.425 $\mu\text{mol BA}/(\text{mg E.dak})$, K_m ise, 15.736 mM olarak saptanmıştır. Novozym 435' in işletme kararlılığını incelemek için tutuklanmış enzim tepkime sonrası süzülüp tekrar aynı tepkime şartlarında kullanılmış, enzim aktivitesi 6 kullanım sonrasında yaklaşık % 60 oranında düşmüştür. Hidroliz tepkimesi ortamına katılan organik çözücülerin hidroliz hızını düşürdüğü tespit edilmiştir. Ancak, hidrofobiklik ile hidroliz hızı arasında doğrudan bir bağlantı kurulamamıştır.

Tribütirinin metanol ile transesterleşme ve metil asetat ile interesterleşme tepkimesi aynı anda gerçekleştirilmiş ve metanol ile beraber metil asetat kullanımının yararları araştırılmıştır. % 100 fazla miktarda (1:6 mol oranında) metanol-metil asetat karışımı kullanımının enzim aktivitesinde negatif bir etki yapmadığı görülmüştür. Tribütirin derişimi arttıkça başlangıç tepkime hızı azalmıştır. Dolayısıyla tribütirin yüksek derişimlerde inhibisyona neden olmaktadır. Tribütirin derişimi, sitokiyometrik oranın (1:3 mol oranı) üzerinde kullanıldığı durumda, enzim aktivitesini düşürmektedir. Tribütirin ve metanol-metil asetat için Michaelis-Menten sabitleri (K_m) sırasıyla 0.1 M ve 50 M olarak hesaplanmış, tribütirinin yarı yarışmalı substrat inhibisyonu yaptığı belirlenerek, tribütirin inhibisyon sabiti, K_{SI} , 22.42 M olarak bulunmuştur. Deneysel veriler substrat

inhibisyonlu ping-pong bi-bi mekanizması sonucunda çıkarılan kinetik modelle uyum göstermektedir. Yarı-sürekli sistemde akışkan yatakta düşük enzim yüzdesiyle (% 1) % 90' lara varan dönüşümler gözlenmiştir. Akış hızı arttıkça dönüşüm azalmıştır.

Anahtar kelimeler : Lipaz, hidroliz, transesterleşme (transesterifikasyon), organik çözücü, ping-pong bi-bi mekanizması.

Danışman : Prof. Dr. Arif Çağlar, Bilkent Üniversitesi, Eğitim Fakültesi

AN INVESTIGATION OF ENZYMATIC SYNTHESIS IN ORGANIC SOLVENT MEDIA USING MODEL SYSTEMS

Burak Veli KABASAKAL

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the applicability of biocatalysis in organic solvent media rather than aqueous media. An immobilized lipase, Novozym 435, and a triglyceride, tributyrin as a model substrate were used. Tributyrin hydrolysis and transesterification / interesterification reactions by Novozym 435 were investigated.

Hydrolysis reactions for both solution and emulsion of tributyrin were observed, and optimum pH, 7.0, optimum temperature, 50 °C, optimum mixing rate, 300 rpm, optimum enzyme concentration, 100 mg immobilized enzyme/30 mL were determined. The enzyme activity obeyed the Michaelis&Menten kinetics for both the solution and emulsion systems. Michaelis&Menten parameters were determined as, V_m , 0.425 $\mu\text{mol BA}/(\text{mg E}\cdot\text{min})$, K_m , 15.736 mM. The operational stability of Novozym 435 was investigated, and the enzyme activity decreased by 60 % after 6 batch uses. The organic solvents added to the reaction media decreased the hydrolysis rate. However, there is no correlation between the hydrophobicity of organic solvents and hydrolysis rate.

Transesterification reaction by methanol and interesterification reaction by methyl acetate were performed simultaneously, and the advantages of using methyl acetate with methanol were investigated. It was observed that 100 % excess amount (1:6 mole ratio) of methanol-methyl acetate makes no negative effect on the enzyme activity. The initial reaction rate decreases as the tributyrin concentration increases. Consequently, tributyrin causes an inhibition at high concentrations. When the tributyrin concentration was used above the stoichiometric ratio (1:3 mole ratio), it decreased the activity of enzyme. Michaelis-Menten parameters (K_m) for tributyrin, and methanol-methyl acetate were calculated as 0.1 M and 50 M, respectively. Uncompetitive substrate inhibition constant for tributyrin was determined as 22.42 M. Experimental results were found to correlate well with the results of kinetic model according to the ping-pong bi-bi mechanism. High conversions up to 90 % were observed in semi-continuous

fluidized bed with low enzyme levels (1 %). Conversions decreased with increasing flow rates. Conversions decreased with increasing flow rates.

Key words : Lipase, hidrolisis, transesterification, organic solvent, ping-pong bi-bi mechanism.

Advisor : Prof. Arif Çağlar, Bilkent University, Graduate Study of Education Department

TEŞEKKÜR

Tez konusu seçiminde yardımcı olan, tecrübelerini ve bilgilerini paylaşan, kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Arif Çağlar' a,

Gerek çalışma ortamı, gerekse laboratuvar olanakları sağlayan hocalarım, başta, Sayın Prof. Dr. Tülin Kutsal, Sayın Prof. Dr. Serdar S. Çelebi ve Sayın Prof. Dr. Erdoğan Alper olmak üzere, Sayın Prof. Dr. Selma Mutlu ve Sayın Prof. Dr. Yeşim Sağ Açıkel' e,

Yardımlarını esirgemeyen ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım, Süreyya, Tuğrul, Feyza ve Hilal' e,

Çalışmam süresince yanımda olan ve değerli fikirlerini paylaşan arkadaşlarım, Osman, Özlem, Salih, Berna, Ceyhun ve Güldem Hoca' ya,

Anlayışları ve destekleri için laboratuvar arkadaşlarım Ceyda ve Oğulcan' a,

Attığım her adımda arkamda olan ve daima yanımda olduklarını hissettiğim sevgili anne ve babama, biricik ablama, moral kaynaklarım Berk ve Tibet' e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Burak Veli Kabasakal

Haziran 2007

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enzimler	3
2.2. Lipaz	4
2.2.1. Lipazların kullanım alanları	5
2.2.2. Lipazla yağların hidrolizi	7
2.2.3. Lipazla transesterleşme tepkimeleri	8
2.2.3.1. İnteresterleşme (interesterification) tepkimesi	8
2.2.3.2. Ping-pong bi-bi mekanizması	10
2.3. Enzim Aktivitesi ve Aktiviteyi Etkileyen Faktörler	12
2.4. Enzim Kinetiği	13
2.4.1. Michaelis-Menten kinetiği	15
2.4.2. Başlangıç tepkime hızları analizi: doğrusallaştırma yöntemleri	17
2.4.3. Enzimlerin inhibisyonu	20
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	23
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	23
3.2. Kullanılan Kimyasallar	23
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	24
3.4. Tribütirin Hidroliz Tepkimesinde Kullanılan Deneysel Yöntemler	25
3.4.1. Tepkime kabı	25
3.4.2. Tepkimelerin izlenmesi	26
3.4.3. Yapılan deneyler	27
3.5. Tribütirin Transesterleşme/İnteresterleşme Tepkimesinde Kullanılan Deneysel Yöntemler	28

3.5.1. Tepkime kabı	28
3.5.2. Tepkimelerin izlenmesi	28
3.5.3. Yapılan deneyler	30
4. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞILMASI.....	33
4.1. Hidroliz Tepkimesi	33
4.1.1. Optimum pH' nın belirlenmesi	34
4.1.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	36
4.1.3. Optimum karıştırma hızının belirlenmesi	36
4.1.4. Optimum enzim derişiminin belirlenmesi	37
4.1.5. Michaelis-Menten sabitlerinin belirlenmesi	38
4.1.6. Kullanılan lipazın işletme kararlılığı	40
4.1.7. Organik çözücülerin hidroliz hızına etkileri	40
4.2. Transesterleşme/İnteresterleşme Tepkimesi	43
4.2.1. Metanol/metil asetat mol oranının belirlenmesi	47
4.2.2. Karıştırma hızının etkisi	48
4.2.3. Metanol-metil asetat derişiminin etkisi	49
4.2.4. Tribütirin derişiminin etkisi	50
4.2.5. Michaelis-Menten sabitlerinin belirlenmesi	51
4.2.6. Tribütirin inhibisyonunun incelenmesi	52
4.2.7. Tribütirin inhibisyon sabitlerinin belirlenmesi	52
4.2.8. Kinetik model	53
4.2.9. Akışkan yatak deneyleri	54
4.2.10. Tepkime ürünlerinin kütle spektroskopisi ile doğrulanması	55
5. SONUÇLAR.....	57
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	60
7. EKLER.....	64
EK 1. HPLC ŞARTLARI	64
EK 2. HPLC KROMATOGRAMLARI	65
EK 3. GC/MS ŞARTLARI	66
EK 4. GC/MS KROMATOGRAMLARI	67
EK 5. GC/MS SPEKTRUM KÜTÜPHANE TARAMA SONUÇLARI	71
8. ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Transesterleşme tepkimesinin ping-pong bi-bi mekanizmasına göre şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.2. Substrat derişimi ile tepkime hızının değişimi	13
Şekil 2.3. Enzim-substrat anahtar-kilit modeli.....	14
Şekil 2.4. Enzim kinetiğinin gösterimi	15
Şekil 2.5. Lineweaver-Burk grafiği	18
Şekil 2.6. Eadie-Hofstee grafiği	19
Şekil 2.7. Hanes-Woolf grafiği	19
Şekil 2.8. Yarı yarışmalı inhibisyonun tepkime hızına etkisi	21
Şekil 3.1. Tribütirin hidrolizinde kullanılan deney düzeneği	26
Şekil 3.2. Tribütirin transesterleşme/interesterleşme tepkimesinde kullanılan akışkan yatak sistemi	29
Şekil 3.3. Akışkan yatak sisteminin şematik gösterimi	32
Şekil 4.1. Optimum pH' nın belirlenmesi-1.....	35
Şekil 4.2. Optimum pH' nın belirlenmesi-2.....	35
Şekil 4.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	36
Şekil 4.4. Optimum karıştırma hızının belirlenmesi	37
Şekil 4.5. Optimum enzim derişiminin belirlenmesi	38
Şekil 4.6. Tribütirin derişimine karşı özgül aktivite grafiği	38
Şekil 4.7. Michaelis&Menten sabitlerinin belirlenmesi- Lineweaver-Burk grafiği	39
Şekil 4.8. Enzimin işletme kararlılığı	40
Şekil 4.9. Organik çözücülerin hidroliz hızına etkileri	43
Şekil 4.10. Metanol/metil asetat oranının belirlenmesi	48
Şekil 4.11. Karıştırma hızının etkisi	49
Şekil 4.12. Metanol-metil asetat derişiminin etkisi	49
Şekil 4.13. Tribütirin derişiminin etkisi	50
Şekil 4.14. Metanol-metil asetat için Lineweaver-Burk grafiği	51
Şekil 4.15. Tribütirin inhibisyonunun incelenmesi	52
Şekil 4.16. Kinetik model ve deneysel sonuçların karşılaştırılması	54
Şekil 4.17. Akışkan yatak deneyleri	55
Şekil Ek2.1. Tribütirin, metil asetat ve metil bütirata ait HPLC kromatogramı	65
Şekil Ek4.1. Transesterleşme/interesterleşme tepkimesinin başında	

alınan örneğin kromatogramı	68
Şekil Ek4.2. Transesterleşme/interesterleşme tepkimesinin ortasında alınan örneğin kromatogramı	69
Şekil Ek4.3. Transesterleşme/interesterleşme tepkimesinin sonunda alınan örneğin kromatogramı	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. pH 6, 7 ve 8 tamponlarının hazırlanışında kullanılan stok çözeltilerin gereken hacimleri	25
Çizelge 4.1. Bazı organik çözücülerin hidrofobiklik (log P) değerleri	41
Çizelge 4.2. Organik çözücülerin hidroliz hızına etkileri	42

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

K_m	Michaelis-Menten sabiti
r_0	Başlangıç tepkime hızı
r_{max}	En yüksek tepkime hızı
E	Enzim
S	Substrat
ES	Enzim-substrat kompleksi
P	Ürün
I	İnhibitör
[E]	Enzim derişimi
[S]	Substrat derişimi
[ES]	Enzim-substrat kompleksinin derişimi
[P]	Ürün derişimi
[I]	İnhibitör derişimi
k_2, k_{cat}	Tepkime hız sabiti
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
K_i	İnhibisyon sabiti
K_{S_i}	Substrat inhibisyon sabiti
GC/MS	Gaz kromatograf/Kütle spektrometresi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatograf
PEG	Polietilen glikol
BA	Bütirik asit
TB	Tribütirin
MB	Metil bütirat

1. GİRİŞ

Normal çevre koşullarında yürütülen tepkimelerde sergiledikleri üstün seçicilikleri ve yüksek katalizleme hızları nedeniyle enzimlerin biyoteknoloji ve biyoproses endüstrilerinde önemli bir yeri vardır. Bununla birlikte, sanayide ve diğer alanlarda daha yaygın uygulanabilmeleri için enzimlerin hem sentez hem de üretim için uygun ortamlarda ve daha geniş aralıkta işlevlerini yerine getirebilmeleri gerekir.

Enzimlerin organik çözücü ortamında kullanılması geleneksel olarak sulu ortamda yapılan biyokatalizlemenin daha büyük bir aralıkta gerçekleşmesini sağlayacaktır. Enzimler organik çözücülerde etkin olarak işlevlerini yerine getirirse de bu ortamlardaki tepkime hızları oldukça düşüktür. Ayrıca, enzimlerin etkinlikleri organik çözücülerde genel olarak yetersizdir ve bu önemli kısıtlama nedeniyle enzimlerin sentezlerde ve ticari uygulamalarda (özellikle de büyük ölçekli üretim koşullarında) kullanımını büyük oranda sınırlamaktadır.

Tepkime hızı ve enzimlerin işletme kararlılığı üzerindeki en büyük etkenler arasında ortamda bulunan çözücünün niteliği, substratın türü ve enzimin fiziksel ve kimyasal durumu (serbest veya katı bir desteğe tutumlu olması) sayılabilir. Bu amaçla, susuz ortamlarda yürütülen enzimlerle yapılan katalizlemeleri etkileyen değişkenlerin saptanması oldukça önemlidir. Enzimlerin katalizleyici etkinliğini organik çözücüler içinde incelemeyi ve temel parametreleri saptamayı hedefleyen araştırmalara olan büyük ihtiyaç nedeniyle burada yapılan tez çalışmasının küçükte olsa bir katkısı olacaktır.

Enzim katalizleme normalde sulu ortamda gerçekleşir. Ancak, organik çözücü ortamında hidroliz enzimleri sentez için de kullanılabilir; çünkü suyun kısıtlı olduğu ortamlarda tepkime ters yönde ilerler.

Bu halde sentezde kullanılacak olan substratların belirlenmesi ve enzimin aktivitesini düşürmeyecek, hatta artıracak koşulların organik ortamda sağlanıp sağlanamayacağının tespit edilmesi için uygun substrat ve çözücü alternatifleri seçilmelidir.

Lipaz enzimi, genellikle yağ asitleri ile alkollerin sentezini katalizleyerek değişik lipid ve lipid türevleri elde etmede kullanılır. Transesterleşme tepkimesi gerek çeşitli organik sentezlerde gerekse biyodizel amaçlı hammaddelerin üretilmesinde kullanılabilir.

Bu tür enzimleri kullanarak uygun dönüştürme ve sentez proseslerinin geliştirilmesi için laboratuvarında incelenmesi kolay model sistemler ve bu model sistemlerin incelenmesi sonucunda biyoreaktör tasarımı için gerekli parametrelerin belirlenmesi ve nihai amaç olarak da bunların optimize edilmesi üzerinde durulacaktır.

Bu çalışmada, tutuklanmış bir lipaz olan Novozym 435 aracılığıyla yağların hidrolizi ve transesterleşme tepkimeleri incelenecektir. Model substrat olarak bir trigliserit olan tribütirin seçilmiştir.

Tribütirin hidrolizi, çözelti ve emülsiyon ortamında incelenip proses parametreleri optimize edilecektir. Bu amaçla, en yüksek hidroliz hızının görüldüğü, optimum pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve enzim derişimi belirlenecektir. Tribütirin hidrolizi kinetik parametreleri, Michaelis-Menten sabitleri, tespit edilecektir. Ayrıca, organik çözücülerin hidroliz hızı üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

Yapılan çalışmalarda, yağların metanol ile transesterleşme tepkimelerinde (metanoliz), karşılaşılan başlıca problemler, metanol inhibisyonu ve oluşan gliserinin enzim yüzeyinde birikmesinden kaynaklanan aktivite kaybıdır. Bu çalışmada, metanol inhibisyonunun ve gliserinden dolayı aktivite kaybının olmadığı, az miktarda enzimle kısa sürede yüksek metil ester veriminin elde edildiği, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin en aza indirildiği bir tepkime sistemi önerilecektir.

Tribütirinin metanol ile transesterleşme tepkimesi, optimize edilecek, karıştırma hızının etkisi, substrat derişiminin etkisi, Michaelis-Menten sabitleri ve inhibisyon olup olmadığı kesikli sistemde yapılan deneyler sonucunda tespit edilecektir. Transesterleşme tepkimeleri deney sonuçlarına dayalı kinetik model önerilecek, kesikli sistemde elde edilecek veriler ışığında tepkimenin sürekli sistemde uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla yarı-sürekli akışkan yatakta tepkimeler izlenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler doğanın katalizörleri olarak düşünülmektedir. Günümüzde birçok enzim biyolojik malzemelerin fermantasyonu ile üretilip farklı substrat özgüllüğü olan binlerce enzim bilinmektedir; fakat bunlardan çok azı saf halde elde edilip kristalize edilmiştir.

Enzimlerin sağladığı yararlar, substrat özgüllüğü, ılımlı reaksiyon koşulları ve düşük proses atığıdır. Bu, doğru enzimin seçilmesiyle hangi ürünlerin üretileceğini kontrol ederek ve istenmeyen yan reaksiyonları en aza indirerek mümkün olabilir. Mikroorganizma kaynaklı enzimler, uygulama alanları, yüksek verimlilikleri, genetik değişime gösterdikleri uyum ve mikroorganizmaların ucuz besi ortamlarında hızlı büyümesi gibi özelliklerinden dolayı bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlerden daha kullanışlıdır.

Dünyadaki mikroorganizmaların sadece yaklaşık % 2' si enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Bakteri türleri, yüksek aktivite sergilemeleri, nötr veya alkali pH' larda üremeleri ve sıcaklığa dayanıklı olmaları nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (Hasan et al., 2006).

Enzimlerin yapısında bileşimi ve işlevi farklı olan iki kısım bulunur. Protein yapısında olan kısma apoenzim, protein yapısında olmayan kısma kofaktör veya koenzim denir. Bu tür enzimlere toplamda haloenzim adı verilir. Enzimin özelliğini ve substrat özgüllüğünü sağlayan kısım apoenzimdir. Apoenzimler yalnız başına katalitik aktivite göstermezler. Apoenzime katalitik aktivite özelliğini veren kısım kofaktördür.

Enzimler kullandıkları substratın veya katalize ettikleri reaksiyonun tipine göre adlandırılmaktadır. Örneğin, üreaz ve alkol dehidrojenaz.

Enzimler genel olarak 6 sınıfa ayrılmaktadır:

1. Oksidoredüktazlar
2. Transferazlar
3. Hidrolazlar
4. Liyazlar

5. İzomerazlar

6. Ligazlar

(Shuler and Kargi, 2002)

2.2. Lipaz

Trigliseritleri hidroliz eden enzimler 300' ü aşkın yıldır çalışılmakla beraber lipazların yağların hidrolizini ve esterlerin sentezini katalize ettiği yaklaşık 70 yıl önce kabul görmüştür.

Lipazlar, kaynakları (bakteri, mantar, memeli hücresi), özellikleri ve katalize ettiği reaksiyon tipine (hidroliz veya sentez) bağlı olarak birbirlerinden ayrılırlar. Lipaz üreten mikroorganizmalardan bazıları aşağıda verilmiştir;

- *Bacillus sp.*
- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus thermoleovorans*
- *Bacillus thermocatenuatus*
- *Bacillus coagulans*
- *Pseudomonas sp.*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Pseudomonas fragi*
- *Enterococcus faecalis*
- *LactoBacillus plantarum*
- *Staphylococcus haemolyticus*
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus xylosus*
- *Penicillium cyclopium*
- *Penicillium simplicissimum*
- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus oryzae*
- *Botrytis cinerea*
- *Chromobacterium viscosum*
- *Streptomyces flavogriseus*
- *Trichosporon asteroides*
- *Trichosporon laibacchii*
- *Rhizopus sp.*
- *Rhizomucor miehei*
- *Geotrichum candidum*
- *Pichia burtonii*
- *Candida cylindracea*
- *Acinetobacter sp.*
- *Fusarium solani*

Sınai önem taşıyan ve yağlardan kimyasal proseslerle imal edilen bazı kimyasallar, ılımlı koşullarda daha hızlı ve saf olarak lipaz yardımıyla üretilebilir. Ayrıca lipazla gıda katkı maddeleri ile saf ve pahalı kimyasalların üretimi de yapılmaktadır.

Bakteri kaynaklı lipazlar, aşağıdaki fizyolojik ve fiziksel özelliklerinden dolayı kullanışlıdır;

- Fazla miktarda saflaştırılmış lipaz mevcuttur.
- Bakteri kaynaklı lipazlar genellikle hayvansal veya bitkisel kaynaklı lipazlara göre daha kararlıdır.
- Lipazlar oda sıcaklığında aktiftir; böylece normal şartlarda yüksek sıcaklık ve basınçlarda yürütülmesi gereken tepkimeler için harcanan enerji ortadan kalkmış olur. Ayrıca yüksek sıcaklık ve basınçta kararsız reaktantların ve ürünlerin zarar görmesi engellenir.
- Termofilik mikroorganizmaların ve enzimlerin yüksek sıcaklıkta ve elverişsiz kimyasal ortamlarda kararlı olmaları sınai uygulamalarda kullanımları açısından faydalıdır.
- Enzimlerin özgülüğü sayesinde normalde çıkış akımında görülen yan ürünler en aza indirilir.
- Enzimlerin kullanımıyla yan reaksiyonların ve reaksiyon sonrası ayırma problemlerinin önüne geçilir.
- Lipazla katalize edilen prosesler, ürün sonrası işlemler açısından geleneksel proseslere göre daha verimlidir.
- Lipazlar organik çözücü ortamlarında aktifliğini korur.
- Tutturulmuş (immobilize) lipazlar kullanıldığında reaktör sıcaklığı 70 °C' ye kadar çıkabilmekte ve reaksiyon süresince enzim aktivitesi korunmaktadır.

(Hasan et al., 2006)

2.2.1. Lipazların kullanım alanları

Lipazlar karboksilik ester bağları üzerine etki eden hidrolaz enzimlerindedir. Lipazların fizyolojik rolü, trigliseritleri hidroliz ederek digliserit, monogliserit, yağ asiti ve gliserine dönüştürmektir. Lipazın doğal fonksiyonu olan karboksilik ester

bağlarının hidrolizine ek olarak lipazlar susuz ortamda esterleşme, interesterleşme ve transesterleşme tepkimelerini de katalize edebilir (Houde et al., 2004)

Lipazlar yararlı biyobozunur bileşiklerin üretilmesinde biyokatalizör olarak kullanılır. Organik çözücülerde ester sentezini ve transesterleşme tepkimelerini katalize etmesi nedeniyle enzimatik biyobozunur poliester üretimi söz konusudur (Linko et al., 1998).

Lipazların ticari olarak önem taşıyan kullanım alanlarından birisi de deterjan sanayisidir. Hidrolitik lipazlar deterjanlara katılarak düşük yıkama sıcaklıklarına olanak tanımakla beraber deterjanlardaki kimyasallar azaltılıp bunların yerine biyoboyunur malzemeler kullanarak çevreye verilen zarar da en aza indirilmeye çalışılmaktadır (Ito et al., 1998).

Regiospesifik ve yağ asitlerine özgül mikrobiyal lipazlar bitkisel yağların işlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Ucuz yağlar, düşük kalorili trigliseritler ve oleik asitçe zengin yağlara dönüştürülmektedir (Gupta et al., 2003). Kısa zincirli yağ asitlerinden ve alkollerden sentezlenen esterler ise gıdalarda tat ve koku ayarlanmasında kullanılmaktadır (Macedo et al., 2003).

Lipazlar rasemik karışımların ayrılmasını sağlayarak ilaç hammaddeleri, zirai kimyasallar ve pestisitler için kiral yapıların sentezlenmesinde kullanılabilir. Bazı lipazlar apolar organik çözücülerde aktivitesini korur. Bu bağlamda stereospesifik hidroliz sonucu ortaya çıkan rasemik karışımların ayrılması gibi suda çözünmeyen esterlerin hidrolizinde lipazlar rol alır (Kirchner et al., 1985).

Medikal sektörde tanı kiti olarak kullanılmaktadır. Lipazın varlığı ya da lipaz seviyesinin yükselmesi belirli bir enfeksiyonun veya hastalığın teşhis edilmesini sağlar. Serumda bulunan trigliseritler enzimatik olarak gliserine dönüştürülüp kolorimetrik yöntemlerle belirlenir (Lott and Lu, 1991).

Lipazlar süt ürünleri sanayisinde, özellikle sütteki yağın hidrolizinde, geniş kullanım alanına sahiptir. Peynir oluşumunun hızlandırılması ve lezzetinin artırılması, peynir türevi ürünlerin imal edilmesi, tereyağın ve kremanın lipolizi güncel uygulamalardandır (Hasan et al., 2006).

Aktif çamurlu sistemlerde ve diğer aerobik atık arıtım proseslerinde havalandırılan tankların yüzeyinde oluşan ince yağ tabakalarının giderilmesinde lipazlar

kullanılmaktadır. Bu, oksijen aktarımına olanak tanıyarak biyokütlenin yaşam koşullarını belirli bir düzeyde tutmaya yarar (Bailey and Ollis, 1986).

2.2.2. Lipazla yağların hidrolizi

Yağların hidrolizi önemli bir sınıai işlemdir. Hidroliz ürünleri olan yağ asitleri ve gliserin birçok uygulamada temel hammadde olarak kullanılmaktadır. Yağ asitleri, yağ alkoller (fatty alcohols), yağ aminleri (fatty amines) ve yağ esterleri (fatty esters) gibi oleo-kimyasalların üretiminde kullanılır. Bu oleo-kimyasallar gres yağı, plastikleştirici ve emülsiyonlaştırıcı olarak ve sabun, deterjan ve hayvan yemi imalatında kullanılır.

Lipazlar su-yağ ara yüzeyinde çalışır. Bu yüzden yağ ile enzimin bulunduğu sulu faz arasında yüksek ara yüzey alanı sağlanırsa hidroliz hızı artar. Yağ sulu fazda çözünmediği için etkin bir karıştırma ile emülsiyon ortamı oluşturmak mümkündür (Noor et al., 2003).

Emülsiyondaki yağ-su ara yüzey alanının artmasıyla hidroliz hızı, Michaelis-Menten kinetiğine uygun olarak artar. Emülsiyon damlacık büyüklüğü, Michaelis-Menten sabiti (K_m) üzerinde etkilidir. Enzim-substrat arasındaki tepkimeler için önerilen Michaelis-Menten kinetiği, substratın çözünür olduğu homojen ve kütle aktarım kısıtlamalarının olmadığı sistemler için geçerlidir. Bu nedenle yağ-su heterojen sistemlerinde Michaelis-Menten kinetiği farklı yorumlanmalıdır. Tepkime ara yüzeyde gerçekleştiğinden Michaelis-Menten hız bağıntısındaki substrat derişimi, enzimle etkileşebilecek ara yüzey derişimi olarak ifade edilir. Ara yüzey derişimi ampirik eşitlikler kullanılarak hesaplanır. Bu gibi sistemler için belirlenen Michaelis sabitleri gerçek K_m değerleri olmayıp emülsiyon ortamı için geçerli olan görünür K_m değerleridir (Çelebi, 1980).

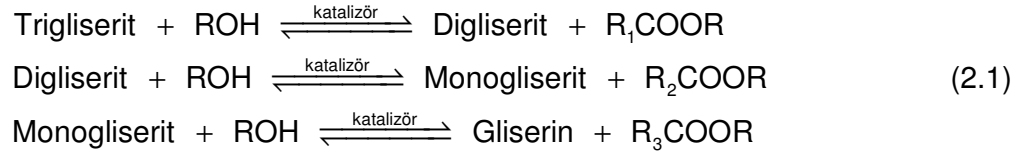
Sulu ve iki fazlı sistemlerde yürütülen hidroliz tepkimeleri, ters miseller, mikro-sulu organik çözücüler ve süperkritik akışkanlar gibi yeni reaksiyon ortamlarında gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Örneğin, esterlerin hidrolizinde sitokiyometrik oranlarda su içeren organik çözücü kullanımı, hidrofobik substratların organik fazdaki yüksek çözünürlükleri ve yığın organik fazda çözünen tepkime ürünleri alkol ve asitin enzim inhibisyonuna etkisinin azalması nedeniyle birçok yarar

sağlar. Bunun yanında asit oluşumundan kaynaklanan pH düşüşü optimum pH' yı etkileyecek derecede olmamaktadır (Yadav and Devi, 2004).

2.2.3. Lipazla transesterleşme tepkimeleri

Transesterleşme tepkimesi katalizörlü veya katalizörsüz olarak birincil ya da ikincil, 1 ile 8 arasında karbon atomu içeren alifatik alkoller kullanılarak gerçekleştirilir (Demirbaş, 2005).

Genel transesterleşme tepkimesi ard arda gerçekleşen üç tersinir denklemlerle ifade edilir;



Birinci basamak trigliseritlerin digliseritlere dönüşümüdür, onu digliseritlerin monogliseritlere ve monogliseritlerin de gliserine dönüşümü takip eder. Her basamakta bir mol gliserit başına bir mol metil ester molekülü oluşur.

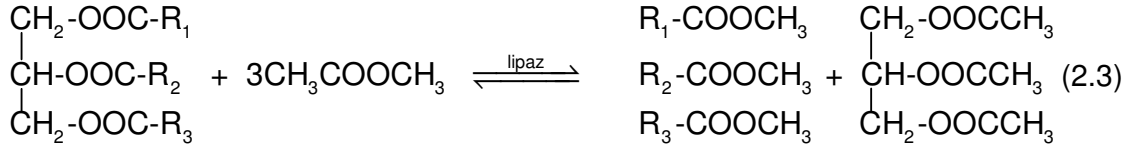
Transesterleşme prosesinin toplam tepkime denklemi şöyledir;



burada R₁, R₂, R₃, birbiriyle aynı veya birbirinden farklı uzun zincirli hidrokarbonlardır (Barnwal and Sharma, 2005).

2.2.3.1. İnteresterleşme (interesterification) tepkimesi

Transesterleşme tepkimesinde açil (COOR) alıcı olarak alkol yerine ester kullanıldığında tepkime interesterleşme ismini alır. Örneğin, Du et al. (2004), metil ester üretmek amacıyla soya fasulyesi yağını metanol yerine metil asetatla dönüştürmüştür. Tepkime denklemi aşağıdaki gibidir;



Teorik olarak transesterleşme tepkimesi bir denge tepkimesidir. Tepkimede yüksek miktarda metanol kullanıldığında tepkime sağa doğru ilerler ve istenen ürün olan metil ester daha çok üretilir. Genellikle tepkime hızını ve verimini artırmak için bir katalizör kullanılır.

Tranesterleşme tepkimelerinde kullanılan alkoller birincil veya ikincil, 1 ile 8 arasında karbon içeren alifatik alkollerdir. Bu alkollere örnek olarak, metanol, etanol, propanol, butanol ve amil alkol verilebilir. Bunlardan en çok metanol ve etanol kullanılmaktadır. Etanol, tarımsal kaynaklardan üretilmesi, yenilenebilir olması, çevreye daha az zararlı olması gibi özelliklerinden, metanol ise, düşük maliyeti, fiziksel ve kimyasal özellikleri (polar ve en kısa zincirli alkol olması) nedeniyle tercih edilmektedir. Transesterleşme tepkimesi, alkaliler, asitler veya enzimlerle katalize edilebilir (Demirbaş, 2005).

Asidik veya alkalik katalizörlerle homojen ya da heterojen katalitik proseslerde gerçekleştirilir. Sodyum ve potasyum hidroksit, ucuz ve yüksek aktivitede olması sebebiyle en çok kullanılan sınaî katalizörlerdir. Öte yandan, bu katalizörlerin bitkisel yağ transesterleşmesinde kullanımı, yağ asitlerinin nötralizasyonu sonucuna bağlı olarak köpük oluşumuna neden olur. Köpük oluşumu istenmeyen bir yan reaksiyondur; çünkü kısmen katalizörün tükenmesine, metil ester veriminin düşmesine, ayrıca, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin zorlaşmasına yol açar. Bu katalizörlerin geri kazanımı teknik olarak zordur ve bu, son ürüne ek maliyet getirir. Bunun dışında, katalizörün geri dönüşümündeki zorluk ve yüksek miktarlarda atık ortaya çıkarması nedeniyle geleneksel katalizörler daha az elverişlidir (Pinto et al., 2005).

Transesterleşme tepkimesinin süresini ve dönüşümü etkileyen en önemli değişkenler; tepkime sıcaklığı, alkol-yağ mol oranı, katalizör tipi ve derişimi, karıştırma hızı, reaktantların saflığı ve kullanılan organik çözücüdür (Srivastava and Prasad, 2000).

Susuz ortamda (organik çözücüler ve süperkritik akışkanlar) lipazla katalize edilen esterleşme ve transesterleşme tepkimeleri son on yılın büyük araştırma konusu

olmuştur. Suyun olmayışı hidroliz tepkimesinin gerçekleşmesini ortadan kaldırır. Bunun yanında, enzimin substrat özgülüğü, regioselektivitesi ve stereoselektivitesi tepkime ortamı değiştirilerek kontrol edilebilir. Lipazla katalize edilen tepkimelerde kullanılan organik çözücüler genellikle susuz olmasına rağmen az miktarda su içerebilir (Gandhi et al., 2000).

Birçok çalışmada su miktarının esterleşme ve transesterleşme tepkimesinin hızı üzerindeki etkisi incelenmiş ve belirli su yüzdelere kadar hızın arttığı daha sonra bir azalışın olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, düşük su aktivitelerinde esterleşmenin üstünlüğü söz konusuysen, su aktivitesinin artmasıyla hidroliz tepkimesinin etkisinin daha çok görülmesidir (Dossat et al., 1999; Kaieda et al., 2001; Yadav and Devi, 2004; Nie et al., 2006).

Tepkime ortamı olarak genellikle heptan, hekzan, toluen, benzen, 1,4-dioksan, izooktan, siklohekzan gibi hidrofobik organik çözücüler kullanılmaktadır. Bunlardan en yüksek transesterleşme veriminin elde edildiği çözücüler; hekzan (Dossat et al., 1999; Fukuda et al., 2001; Soumanou and Bornscheuer, 2003; Nie et al., 2006), heptan (Yadav and Trivedi, 2003; Yadav and Devi, 2004) ve toluen (Yadav and Lathi, 2005) olmuştur. Bunun yanında, organik çözücü içermeyen tepkime ortamları da çalışılmıştır (Kaieda et al., 2001; Soumanou and Bornscheuer, 2003; Du et al., 2004).

Kullanılan alkol çeşidinin etkisi incelenirken, düz zincirli alkollerle aromatik ve dallanmış alkollere göre daha yüksek dönüşümler elde edilmiş (Yadav and Trivedi, 2003), birincil alkollerin karbon sayıları arttıkça metil ester dönüşümü azalmış, en yüksek verim, izoamil alkolle elde edilmiştir (Nie et al., 2006).

Bilinen yararları nedeniyle genellikle serbest enzimler yerine tutturulmuş (immobilize) ticari enzimlerle tepkimeler yürütülmüştür. En çok kullanılan ticari enzimler, Novozym 435, Lipozyme RM IM ve Lipozyme TL IM ' dir. Novozym 435 en etkili enzim olarak tespit edilmiştir (Fukuda et al., 2001; Yadav and Trivedi, 2003; Yadav and Devi, 2004; Yadav and Lathi, 2005).

2.2.3.2. Ping-pong bi-bi mekanizması

Substrat inhibisyonu olmadığı durumlarda transesterleşme tepkimesinin kinetiği ping-pong bi-bi mekanizması ile ifade edilebilir (Srivastava and Prasad, 2000).

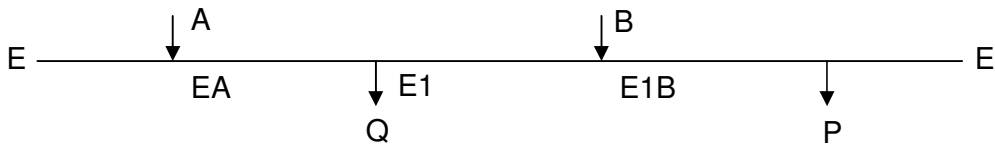
Başlangıç hız ölçümlerine göre tepkime hızı, reaktantların (yağ ve alkol) derişimi arttıkça artar. İki substratın da inhibisyon etkisi söz konusu değildir. Farklı başlangıç B derişimleri ile $1/r_0$ ' a karşı $1/A_0$ Lineweaver Burk grafikleri çizildiğinde paralel doğrular elde edilir (A: Yağ, B: Alkol). Bu doğruların bir kesişim noktası yoktur; bu nedenle seri halinde gerçekleşen bir mekanizmadan bahsetmek mümkündür. Bu mekanizmada, bir ürün ortaya çıkar, daha sonra diğer substrat enzime bağlanır.

Başlangıç koşulları için hız denklemi aşağıdaki gibidir;

$$\frac{r_0}{r_{\max}} = \frac{[A_0][B_0]}{K_{mB}[A_0] + K_{mA}[B_0] + [A_0][B_0]} \quad (2.4)$$

burada r_0 , başlangıç tepkime hızı, r_{\max} , en yüksek tepkime hızı, $[A_0]$, başlangıç yağ derişimi, $[B_0]$, başlangıç alkol derişimi, K_{mA} , yağ için Michaelis sabiti, K_{mB} , alkol için Michaelis sabitidir.

Ping-pong bi-bi mekanizmasına göre, öncelikle yağ (A) lipaza (E) bağlanır ve yağ-enzim kompleksini (EA) oluşturur. Daha sonra gliserin (Q) ortaya çıkarak EA kompleksi karboksilik lipaza (E1) dönüşür. Karboksilik lipazla (E1), alkol (B) tepkimeye girerek başka bir kompleks (E1B) oluşturur. Bunu metil ester (P) oluşumu ve serbest lipazın (E) tepkimeyi terk etmesi takip eder (bkz. Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Transesterleşme tepkimesinin ping-pong bi-bi mekanizmasına göre şematik gösterimi

Düşük A derişimlerinde, $E + A \leftrightarrow EA$ tepkimesi hızı belirleyen basamaktır. B' nin derişiminin artması, daha çok E1' in, E1B' ye dönüşmesine neden olur. E1 derişimindeki azalma, $E1B \leftrightarrow E1 + B$ tepkimesini sağa kaydırarak E1B derişiminin düşmesine, bu da $EA \leftrightarrow E1B$ tepkimesinin sağ yönde ilerlemesine neden olur. Bu şekilde hızı kısıtlayan basamaktaki etkinin aynısı gerçekleşir. Dolayısıyla, düşük A derişimlerinde, B' nin derişimdeki değişimin hız üzerinde bir etkisi yoktur;

Lineweaver Burk grafiğinin eğimi değişmez. Bu, ping-pong bi-bi mekanizmasının tipik bir özelliğidir (Yadav and Lathi, 2005).

A' nın inhibisyonu varlığında denklem;

$$\frac{r_0}{r_{\max}} = \frac{[A_0][B_0]}{K_{mB} [A_0] \left(1 + \frac{[A_0]}{K_{IA}}\right) + K_{mA} [B_0] + [A_0][B_0]} \quad (2.5)$$

halini alır (Rizzi et al., 1992).

burada r_0 , başlangıç tepkime hızı, r_{\max} , en yüksek tepkime hızı, $[A_0]$, başlangıç yağ derişimi, $[B_0]$, başlangıç alkol derişimi, K_{mA} , yağ için Michaelis sabiti, K_{mB} , alkol için Michaelis sabiti, K_{IA} , A (yağ) için inhibisyon sabitidir.

Farklı başlangıç A derişimleri ile $1/r_0$ ' a karşı $1/B_0$ Lineweaver Burk grafikleri çizildiğinde paralel doğrular elde edildiğinde bu, A' nın yarı yarışmalı inhibisyon yaptığının bir göstergesidir (Yadav and Devi, 2004).

2.3. Enzim Aktivitesi ve Aktiviteyi Etkileyen Faktörler

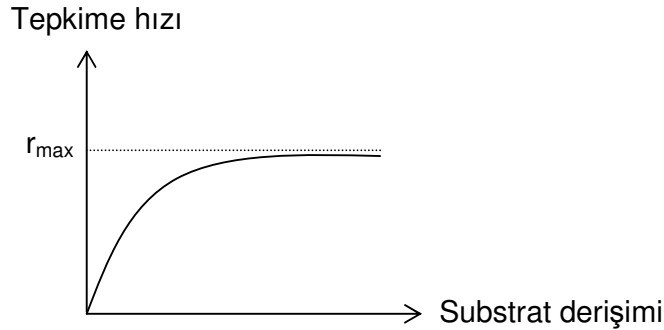
Enzimler belirli tepkimeleri katalize ederek substratları ürüne dönüştürürler. Tepkime ortamında zamanla ürün derişiminin artması ya da substrat derişiminin azalması enzim aktivitesinin bir ölçüsüdür. Enzim aktivitesinin birimi olan enzim ünitesi belirli koşullarda 1 μ mol substratı, 1 dakikada ürüne çeviren enzim miktarıdır.

Enzim aktivitesini genel olarak sıcaklık, ortam pH' sı, substrat ve enzim derişimi etkiler. Bunun dışında ürün derişimi, çeşitli koenzim ve kofaktörlerin derişimi, karıştırma hızı ve enzimin kullanım süresi gibi etmenler de söz konusudur.

- Sıcaklık: Kimyasal tepkimelerde olduğu gibi sıcaklık enzimle katalize edilen tepkimelerin hızını Arrhenius eşitliğine uygun olarak artırır. Sıcaklık arttıkça moleküller arasındaki çarpışmalar artar ve böylece aktivasyon enerjisini aşan moleküllerin sayısı artar. Sıcaklıkla enzimatik tepkime hızı bir maksimuma ulaşır. Bu nokta aynı zamanda optimum sıcaklık değerine

tekabül eder; çünkü bu noktadan sonra sıcaklığın artması enzimin denatüre olmasına ve tepkime hızının düşmesine sebep olur.

- pH: Tepkime ortamındaki H^+ iyon derişimi, enzimin aktivitesini etkileyen bir diğer parametredir. Her enzimin aktivite gösterdiği farklı pH değerleri vardır. En yüksek aktivitenin gözleendiği pH' ya optimum pH adı verilir. Bu pH' nın etrafındaki pH' larda enzim aktivitesi daha düşüktür. Enzimle katalize edilen tepkimelerde pH' yı sabit tutmak için tampon çözeltiler kullanılır.
- Substrat derişimi: Sabit enzim derişimi için substrat derişimi arttıkça tepkime hızı belli bir substrat derişimine kadar artar ve yüksek substrat derişimlerinde tepkime hızı daha fazla artmaz ve bir platoya erişir. Bu noktadaki hız değeri maksimum hız (r_m) olarak da adlandırılır. Şekil 2.2' de substrat derişimiyle enzimatik tepkime hızının değışimi gösterilmektedir. Bazı durumlarda yüksek substrat derişimlerinde tepkime hızı azalır. Bu durumda substrat inhibisyonu söz konusudur.
- Enzim derişimi: Substrat derişimi kısıtlayıcı olmadığında enzimatik tepkime hızı enzim derişimi ile doğru orantılı olarak artar. Tutuklanmış enzim sistemlerinde yüksek enzim derişimlerinde dış kütle aktarım kısıtlamalarından ötürü tepkime hızı belli bir değere kadar artar ve sabitlenir (Bailey and Ollis, 1986).



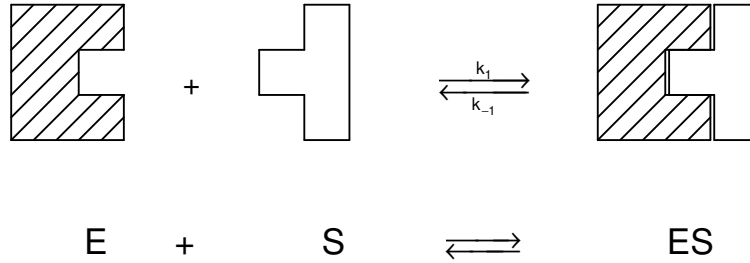
Şekil 2.2. Substrat derişimi ile tepkime hızının değışimi

2.4. Enzim Kinetiği

Enzimler substrata bağlanarak ve enzim substrat kompleksi oluşturarak katalizledikleri tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürürler. Serbest enerji yükünü ya da denge sabitini etkilemezler.

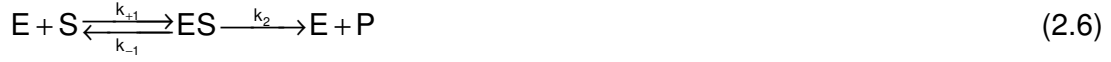
X ışını ve Raman spektroskopisi kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalar enzim-substrat (ES) kompleksinin varlığını ortaya çıkarmıştır. Ancak enzim-substrat etkileşimi moleküler açıdan henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu etkileşim farklı enzim-substrat kompleksleri için farklı olabilmektedir. Enzim ve substratı arasındaki etkileşim genellikle zayıf kuvvetlerle olmaktadır. Çoğunlukla van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağı ES komplekslerinin oluşumunu sağlar. Substrat aktif bölge olarak bilinen enzimin özel bir bölgesine bağlanır. Substrat bağıl olarak küçük bir moleküldür ve çok daha büyük olan enzim molekülünde belli bir bölgeye yapısal olarak uyar. Bu etkileşimi anlatan en basit model Şekil 2.3' te gösterildiği gibi, enzimi kilit, substratı anahtar olarak alan anahtar-kilit modelidir.

Tek substrat-enzim katalizli tepkimelerin kinetiğinin matematiksel modeli ilk defa V.C.R. Henri tarafından 1902' de ve L. Michaelis ve M.L. Menten tarafından 1913' te geliştirilmiştir.

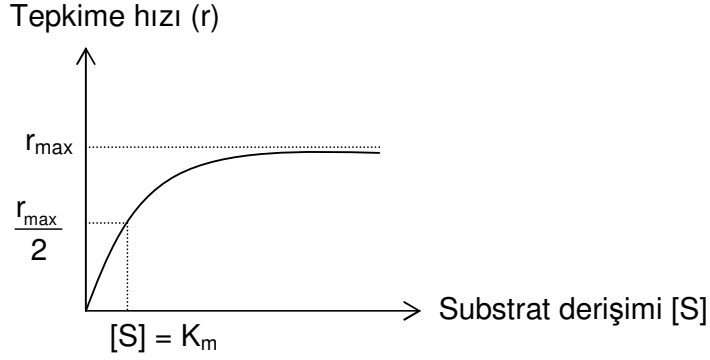


Şekil 2.3. Enzim-substrat anahtar-kilit modeli

Basit enzim katalizli tepkimelerin kinetiğinden genellikle Michaelis-Menten kinetiği ya da doyumluk kinetiği olarak söz edilir. Enzim kinetiğinin nitel özellikleri Langmuir-Hinshelwood kinetiğine benzer (bkz. Şekil 2.4). Bu modeller başlangıç substrat ve enzim derişimlerinin bilindiği sabit sıvı hacimli kesikli reaktörlerden elde edilen veriyi temel alır. Çok substratlı-çok enzimli tepkimeler gibi daha karmaşık enzim-substrat etkileşimi biyolojik sistemlerde yer almaktadır. Sabit enzim derişimli bir çözeltide substrat moleküllerinin bağlanabileceği belli sayıda aktif bölge vardır. Yüksek substrat derişimlerinde, bütün bu aktif bölgeler substrat molekülleri tarafından tutulur ya da enzim doyurulur. Doyumluk kinetiği enzim-substrat kompleksinin oluştuğu tersinir tepkimesi ve ES kompleksinin ürün ve enzime bozunma tepkimesini içeren basit bir tepkime sistemiyle gösterilebilir.



Bu modelde ES kompleksinin çok hızlı oluştuğu kabul edilir ve ikinci tepkimede geri yöndeki tepkime hızı ihmal edilir (Shuler and Kargi, 2002).



Şekil 2.4. Enzim kinetiğinin gösterimi

Enzim katalizli tepkimelerde hız ifadesini geliştirmede iki temel yaklaşım vardır:

- (1) Hızlı denge yaklaşımı
- (2) Yatışkımsı durum yaklaşımı

2.4.1. Michaelis-Menten kinetiği

Hem hızlı denge yaklaşımı hem de yatışkımsı durum yaklaşımı "Eşitlik 2.6." daki mekanizma için hız ifadesinin türetilmesinde aynı başlangıç aşamalarından geçer.

Ürün oluşum hızı:

$$r = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_2 [ES] \quad (2.7)$$

burada r ürün oluşum hızı ya da substrat tüketim hızıdır, hız sabiti k_2 , k_{cat} olarak da gösterilebilir.

ES derişiminin değişim hızı:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] \quad (2.8)$$

şeklinde yazılır.

Tepkimede enzim tüketilmediğinden enzimin korunumu eşitliği sabit sıvı hacimli kesikli bir sistemde aşağıdaki gibi yazılır;

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad (2.9)$$

Bu noktada, analitik çözümü gerçekleştirmek için kabul gereklidir.

1. Hızlı denge yaklaşımı: Henri ve Michaelis-Menten bu yaklaşımı kullanmıştır. “Eşitlik 2.6.” ve “Eşitlik 2.8” teki k_2' nin k_1' den çok daha küçük olduğu kabul edilirse, ES kompleksi oluşumunda enzim ve substrat arasında hızlı denge olduğu varsayımıyla ;

Denge sabiti;

$$K'_m = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (2.10)$$

şeklindedir.

“Eşitlik 2.9” dan, $[E_0] = [E] + [ES]$ “Eşitlik 2.10” da yerine konursa

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{\left(\frac{k_{-1}}{k_{+1}}\right) + [S]} \quad (2.11)$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K'_m + [S]} \quad (2.12)$$

eşitlikleri elde edilir. Burada $K'_m = k_{-1}/k_{+1}$, ES kompleksinin ayrışma sabitidir. “Eşitlik 2.12.”, “Eşitlik 2.7” de yerine konursa tepkime hızı,

$$r = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \frac{[E_0][S]}{K'_m + [S]} = \frac{r_m [S]}{K'_m + [S]} \quad (2.13)$$

ifadesi elde edilir. Burada $r_m = k_2[E_0]$ dir.

Bu sistemde r_m daha fazla enzim eklenirse değişir. Fakat daha fazla substrat eklenmesi r_m değerini etkilemez. K'_m genellikle Michaelis-Menten sabiti olarak adlandırılır ve üs işareti bunun hızlı denge kabulü ile türetildiğini gösterir. Aynı zamanda K'_m , maksimum tepkime hızının yarısını veren substrat derişimine karşı gelir.

2. Yatışkinımsı durum yaklaşımı: Enzim-substrat tepkimesi doaygunluk kinetiğini göstermesine rağmen birçok durumda özellikle kütle aktarım kısıtlamaları olduğunda hızlı denge kabulü geçerli olmaz.

Yatışkinımsı durum kabulü ilk olarak G.E. Briggs ve J.B.S. Haldane tarafından önerilmiştir. Birçok deneysel sistemde başlangıç substrat derişiminin başlangıç enzim derişiminden çok yüksek olduğu kesikli reaktör kullanılır. $[E_0]$ değeri küçük olduğundan yatışkinımsı durum kabulü ile $d[ES]/dt \approx 0$ alınabilir.

Bu durumda “Eşitlik 2.8.” den,

$$[ES] = \frac{k_{+1}[E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad (2.14)$$

elde edilir.

“Eşitlik 2.14.”, “Eşitlik 2.9.” da yerine konursa aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$[ES] = \frac{k_{+1}([E_0] - [ES])[S]}{k_{-1} + k_2} \quad (2.15)$$

$[ES]$ için “Eşitlik 2.15.” çözülrse,

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_{+1}} + [S]} \quad (2.16)$$

elde edilir.

Bu eşitlik, “Eşitlik 2.7.” de yerine konursa,

$$r = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \frac{[E_0][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_{+1}} + [S]} \quad (2.17)$$

ve $K'_m = (k_{-1} + k_2)/k_{+1}$, $r_m = k_2[E_0]$ diye tanımlanırsa,

$$r = \frac{d[P]}{dt} = \frac{r_m [S]}{K'_m + [S]} \quad (2.18)$$

eşitliği elde edilir (Shuler and Kargi, 2002).

2.4.2. Başlangıç tepkime hızları analizi: doğrusallaştırma yöntemleri

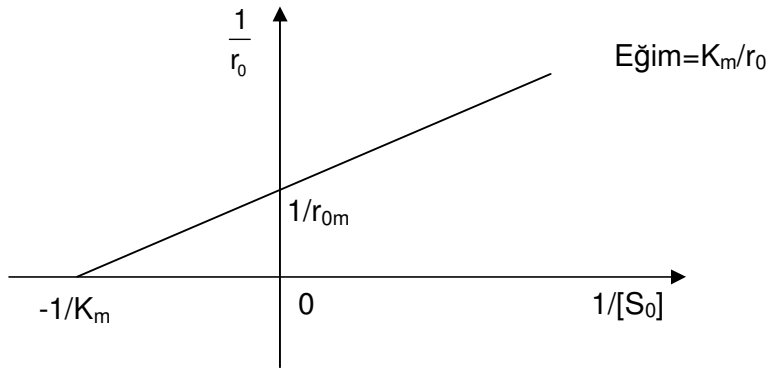
Enzimatik tepkimelerin kinetik parametrelerinin bulunmasında genellikle doğrusallaştırma yöntemleri kullanılır. Kesikli bir reaktöre belli derişimlerde substrat $[S_0]$ ve enzim $[E_0]$ yüklenir. Ürün ya da substrat derişimi zamana karşılık grafiğe geçirilir. Bu eğrinin başlangıç eğimi ile tepkime hızı belirlenir. Başlangıç hızı r_0 değerleri reaktöre eklenen $[S_0]$ ve $[E_0]$ değerlerine bağlıdır. $[S_0]$ değerlerine karşılık gelen r_0 değerlerini içeren veri setlerini oluşturmak için çok sayıda deney yapılır. Bunlar Şekil 2.4' deki gibi grafiğe geçirilebilir; fakat böyle bir grafikten kinetik parametrelerin kesin değerlerini saptamak çok zordur.

Bu yüzden Michaelis-Menten eşitliğinin "Lineweaver-Burk", "Eadie-Hofstee" ve "Hanes-Woolf" gibi grafiksel yöntemlerle doğrusallaştırılmasıyla kinetik parametreler belirlenir.

1. Lineweaver-Burk grafiği:

Michaelis-Menten eşitliği "Eşitlik 2.19." daki gibi doğrusallaştırılabilir. Bu eşitliğe göre $1/[S_0]$ ' a karşılık $1/r_0$ grafiğe geçirilirse doğrunun $1/[S_0]$ eksenini kesen nokta $1/K_m$, $1/r_0$ eksenini kesen nokta $1/r_{0m}$ ve doğrunun eğimi de K_m/r_{0m} değerini verir. Bu çizim, genellikle, "Lineweaver-Burk" ya da "Double-reciprocal" grafiği olarak bilinir ve Şekil 2.5' te gösterildiği gibidir.

$$\frac{1}{r_0} = \frac{1}{r_{0m}} + \frac{K_m}{r_{0m}} \frac{1}{[S_0]} \quad (2.19)$$



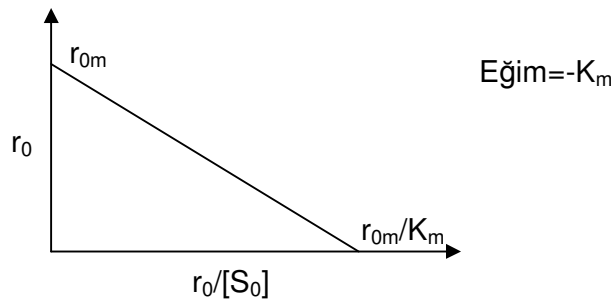
Şekil 2.5. Lineweaver-Burk grafiği

2. Eadie-Hofstee grafiği:

“Eşitlik 2.19.” un her iki tarafı $r_0 \cdot r_{0m}$ ile çapılırsa ve eşitlik yeniden düzenlenirse “Eşitlik 2.20.” elde edilir.

$$r_0 = r_{0m} - K_m \frac{r_0}{[S_0]} \quad (2.20)$$

Bu eşitlik, $r_0/[S_0]$ ’ a karşılık r_0 doğrusunun eğiminin $-K_m$, kesim noktalarının ise r_0 ekseninde r_{0m} ve $r_0/[S_0]$ ekseninde r_{0m}/K_m olduğunu gösterir. Şekil 2.6’ da gösterilen bu grafik, çoğunlukla, Eadie-Hofstee grafiği olarak adlandırılır.



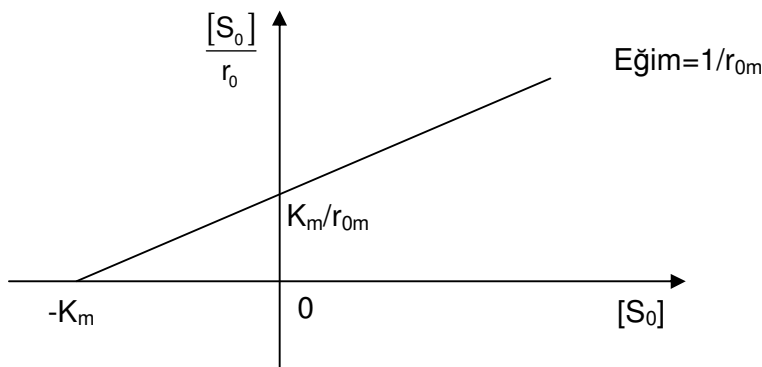
Şekil 2.6. Eadie-Hofstee grafiği

3. Hanes-Woolf grafiği:

“Eşitlik 2.19.” un her iki tarafı $[S_0]$ ile çapılırsa ve eşitlik yeniden düzenlenirse “Eşitlik 2.21.” elde edilir.

$$\frac{[S_0]}{r_0} = \frac{K_m}{r_{0m}} + \frac{1}{r_{0m}} [S_0] \quad (2.21)$$

Bu eşitliğe göre $[S_0]$ ’ a karşılık $[S_0]/r_0$ grafiği, eğimi $1/r_{0m}$ ve kesim noktaları $[S_0]/r_0$ ekseninde K_m/r_{0m} , $[S_0]$ ekseninde $-K_m$ olan bir doğru olmalıdır. Şekil 2.7’ de gösterilen bu grafik Hanes-Woolf grafiği olarak bilinir (Shuler and Kargi, 2002).



Şekil 2.7. Hanes-Woolf grafiği

2.4.3. Enzimlerin inhibisyonu

Bazı bileşikler enzimlere bağlanıp onların aktivitelerini azaltabilirler. Bu bileşikler enzim inhibitörleri olarak bilinirler. Enzim inhibisyonu tersinir veya tersinmez olabilir. Ağır metaller (kurşun, kadmiyum, cıva ve diğerleri) gibi tersinmez inhibitörler, enzimle kararlı bir kompleks oluştururlar ve enzim aktivitesini azaltırlar. Bu tür enzim inhibisyonları ancak EDTA ve sitrat gibi şelat oluşturan ajanlarla engellenebilir. Tersinir inhibitörler ise bağlanmadan sonra enzimden çok daha kolay ayrılabilir. Tersinir enzim inhibisyonları yarışmalı, yarışmasız ve yarı yarışmalı olmak üzere başlıca üç şekilde olur (Shuler and Kargi, 2002).

Yarı yarışmalı ürün inhibisyonu: Bu inhibisyon türünde inhibitörler ES kompleksine bağlanır ve enzime karşı bir ilgileri yoktur. Yarı yarışmalı inhibisyonun mekanizması şöyledir;



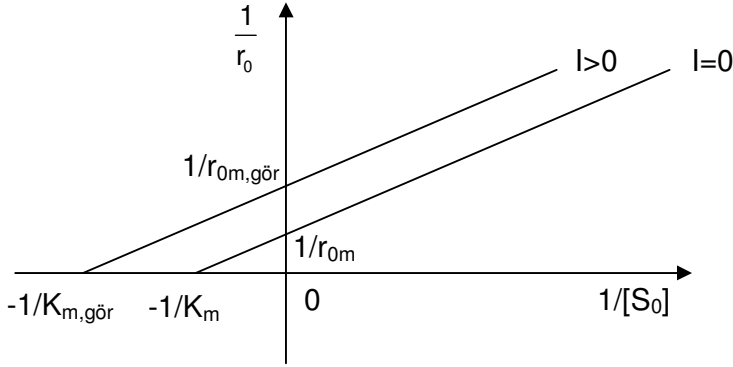
$$K'_m = \frac{[E][S]}{[ES]}, K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}, [E_0] = [E] + [ES] + [ESI] \text{ ve } r = k_2 [ES] \tag{2.23}$$

tanımları ile tepkime hızı için aşağıdaki eşitlik çıkarılabilir;

$$r = \frac{\frac{r_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} [S]}{\frac{K'_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} + [S]} \tag{2.24}$$

$$r = \frac{r_{m,\text{görünen}} [S]}{K'_{m,\text{görünen}} + [S]} \quad (2.25)$$

Yarı yarışmalı inhibisyonda, r_m ve K'_m değerleri azalır. r_m 'deki azalma daha çok etkilidir. Genel sonucu tepkime hızının düşmesidir. Yarı yarışmalı inhibisyonun etkisi Lineweaver-Burk grafiği ile Şekil 2.8' de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Yarı yarışmalı inhibisyonun tepkime hızına etkisi

Substrat inhibisyonu: Yüksek substrat derişimleri bazı enzimatik tepkimelerde inhibisyona neden olabilir. Yarı yarışmalı substrat inhibisyonunun mekanizması şöyledir;



$$K'_m = \frac{[E][S]}{[ES]}, K_{SI} = \frac{[S][ES]}{[ES_2]} \quad (2.27)$$

tanımları ve hızlı denge varsayımı ile tepkime hızı için aşağıdaki eşitlik çıkarılabilir;

$$r = \frac{r_m [S]}{K'_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_{SI}}} \quad (2.28)$$

Düşük substrat derişimlerinde, $[S]^2/K_{SI} \ll 1$ dir ve inhibisyon etkisi görülmez. Hız;

$$r = \frac{r_m}{1 + \frac{K'_m}{[S]}} \quad (2.29)$$

veya

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_m} + \frac{K'_m}{r_m} \frac{1}{[S]} \quad (2.30)$$

$1/r'$ ye karşı $1/[S]$ grafiği, eğimi K'_m/r_m , kesim noktası $1/r_m$ olan bir doğrudur.

Yüksek substrat derişimlerinde, $K'_m/[S] \ll 1$ dir ve inhibisyon baskındır. Bu durumda hız;

$$r = \frac{r_m}{1 + \frac{[S]}{K_{SI}}} \quad (2.31)$$

veya

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_m} + \frac{[S]}{K_{SI}r_m} \quad (2.32)$$

$1/r'$ ye karşı $[S]$ grafiği, eğimi $1/K_{SI} \cdot r_m$, kesim noktası $1/r_m$ olan bir doğru verir

(Shuler and Kargi, 2002).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalkalayıcı	: Edmund Bühler Labortechnik orbital çalkalayıcı
GC/MS	: Agilent 6890 GC System 5973 MSD
GC kolonu	: HP-5MS, 0.25 mm×30 m×0.25 µm
Hassas terazi	: Sartorius DT-210
HPLC	: Agilent 1100 HPLC, Değişken Dalga Boyu Detektörlü
HPLC kolonu	: Hichrom C18 ters faz kolon, 10 cm, 4.6 mm i.d.
Kesikli reaktör	: Mettler DL 21, karıştırma hızı kontrollü, Pyrex ceketli cam reaktör
pH Metre	: Mettler DL 21, pH-stat, titrasyon cihazı
Peristaltik pompa	: Watson Marlow 502 S
Sabit sıcaklık banyosu	: Grant LTD 6-G ısıtma soğutma sistemli sirkülatör

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Asetik asit	: Merck, Almanya
Benzen	: BDH, İngiltere
Dibazik sodyum fosfat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	: Surechem Products Ltd., İngiltere
Hekzan	: BDH, İngiltere
Heptan	: BDH, İngiltere
Kloroform	: BDH, İngiltere
Lipaz	: Novozym 435, poliakrilik reçine içine hapsedilmiş <i>Candida antarctica</i> lipazı, Novozymes, Danimarka

Metanol	: Merck, Almanya
Metil asetat	: BDH, İngiltere
Monobazik sodyum fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	: Surechem Products Ltd., İngiltere
Oktan	: Fisher, ABD
Sodyum asetat	: Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	: Merck, Almanya
Tribütirin	: BDH, İngiltere

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Sodyum asetat çözeltisi (0.2 M): 5.44 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 200 mL saf suda çözülerek hazırlanır.

Asetik asit çözeltisi (0.2 M): Yoğunluğu 1.05 g/mL olan % 99.99' luk derişik asetik asitten (CH_3COOH) 2.86 mL alınıp 250 mL' ye saf suyla seyreltilir.

Dibazik sodyum fosfat çözeltisi (0.2 M): 35.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 L saf suda çözülerek hazırlanır.

Monobazik sodyum fosfat çözeltisi (0.2 M): 31.2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 L saf suda çözülerek hazırlanır.

Tampon çözeltilerin hazırlanması: pH'sı 4, 5, 6, 7 ve 8 olan tamponların hazırlanış yöntemleri aşağıda verilmiştir :

- pH 4 ve 5 tamponları sodyum asetat ve asetik asit çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. 0.2 M asetik aside istenilen pH elde edilene kadar 0.2 M sodyum asetat eklenir.
- pH 6, 7 ve 8 tamponları 0.2 M monobazik sodyum fosfat (Çözelti A) ve 0.2 M dibazik sodyum fosfat (Çözelti B) stok çözeltilerinin belli oranlarda karıştırılıp belli bir hacme seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Bu oranlar Çizelge 3.1' de verilmiştir.

İstenilen pH için A ve B çözeltilerinden çizelgedeki hacimler kadar alınır ve çözelti 250 mL' ye saf su ile seyreltilir.

Çizelge 3.1. pH 6, 7 ve 8 tamponlarının hazırlanışında kullanılan stok çözeltilerin gereken hacimleri

pH	Çözelti A (mL)	Çözelti B (mL)
6	15.375	109.375
7	76.25	48.75
8	118.375	6.625

Tribütirin çözeltileri (% 0.015 ve % 1 (v/v)): % 0.015' lik tribütirin çözeltisi için 150 µL, % 1' lik tribütirin çözeltisi için 10 mL tribütirin, 1 L saf suya seyreltilerek hazırlanır. Çözeltilerin ilki homojendir, ikincisi ise emülsiyon halindedir.

Transesterleşme/İnteresterleşme tepkime çözeltileri: Tepkime çözeltileri belirli hacimlerde saf tribütirin, metanol ve metil asetat karıştırılarak hazırlanmıştır. Çözeltiler homojendir.

HPLC hareketli fazı: 900 mL metanol ve 100 mL saf su karıştırılarak hazırlanır.

3.4. Tribütirin Hidroliz Tepkimesinde Kullanılan Deneysel Yöntemler

3.4.1. Tepkime kabı

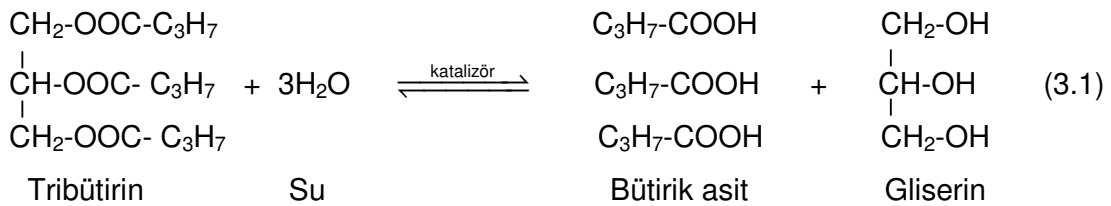
Tribütirinin tutuklanmış lipaz enzimi ile hidroliz tepkimesi ceketli 100 mL hacimli cam reaktörde yapılmıştır. Tepkime ortamının homojenliği hız kontrollü karıştırıcı sistemi ile sağlanmıştır. Ayrıca tepkimeyi farklı sıcaklıklarda ve sabit sıcaklıkta yürütebilmek için reaktörün etrafındaki ceketle bulunan su, döngülü sabit sıcaklık banyosundan sürekli olarak geçirilmiştir. Tepkime ortamının verimli karışması için kabın cidarına üç adet tampon levha (baffle) yerleştirilmiştir. Sözü edilen deney sistemi Şekil 3.1' de verilmiştir.



Şekil 3.1. Tribütirin hidrolizinde kullanılan deney düzeneği

3.4.2. Tepkimelerin izlenmesi

Tribütirin sulu ortamda lipaz yardımıyla hidrolize uğradığında tepkime ortamında gliserin ve bütirik asit ortaya çıkmaktadır (Eşitlik 3.1). Bu da tepkime ortamının pH'ının düşmesine sebep olmaktadır. Yani ürün derişimi ile pH azalması doğru orantılıdır. Dolayısıyla pH izlenerek veya tepkime ortamı uygun derişimde bir baz ile titre edilerek tepkime hızına geçilebilir. Bu çalışmada tepkime ortamı 0.05 N NaOH ile pH düşmesiyle eş zamanlı olarak titre edilerek tepkime hızı ifadesine geçilmiştir. Bu işlem, eklenen baz hacmini zamanla kaydeden bir yazıcıya bağlı Mettler Toledo DL 21 marka pH-stat cihazı yardımıyla yapılmıştır. pH-stat sistemi ile ortam pH'sı baz eklenerek sabit tutulmaya çalışılır. Böylece hem tepkime hızı belirlenir hem de ortam pH'sının azalmasından kaynaklanabilecek enzim denatürasyonunun önüne geçilmiş olur.



3.4.3. Yapılan deneyler

Optimum pH' nın belirlenmesi: Novozym 435 ile tribütirinin hidroliz tepkimesi 4 ile 8 arasında değişen farklı pH' lardaki tampon çözeltilerde yürütülmüştür. Tepkime şartları : 20 mL tepkime hacmi, % 0.01 tribütirin, 100 mg enzim, 40 °C sıcaklık, 400 rpm karıştırma hızı şeklindedir.

Optimum sıcaklığın belirlenmesi: En yüksek lipaz aktivitesinin gözlemlendiği sıcaklığı tespit etmek amacıyla 20 ile 70 °C arasındaki sıcaklık değerlerinde tepkime hızları belirlenmiştir. Tepkime şartları : 20 mL tepkime hacmi, % 0.01 tribütirin, 100 mg enzim, pH 7.0, 400 rpm karıştırma hızı şeklindedir.

Optimum karıştırma hızının belirlenmesi: Karıştırma hızının etkisini incelemek için 0 ile 500 rpm arasındaki hızlarda tepkimeler yürütülüp aktivite ölçümleri yapılmıştır. Tepkime şartları : 20 mL tepkime hacmi, % 0.01 tribütirin, 100 mg enzim, 50 °C sıcaklık, pH 7.0 şeklindedir.

Optimum enzim derişiminin belirlenmesi: Belirli hacimdeki tepkime ortamı için en uygun enzim miktarının belirlenmesi amacıyla 50 ile 300 mg arasında Novozym 435 kullanılarak tepkime hızları tespit edilmiştir. Tepkime şartları : 30 mL tepkime hacmi, % 0.01 tribütirin, 50 °C sıcaklık, pH 7.0, 300 rpm karıştırma hızı şeklindedir.

Michaelis & Menten sabitlerinin belirlenmesi: Michaelis & Menten kinetiğine uygunluk gösteren tribütirinin Novozym 435 ile hidroliz tepkimesinin hız ifadesini çıkarmak amacıyla kinetik parametrelerin belirlenmesi için farklı tribütirin derişimlerinde aktivite ölçümleri yapılmıştır. Tepkime şartları : 20 mL tepkime hacmi, 100 mg enzim, 50 °C sıcaklık, pH 7.0, 300 rpm karıştırma hızı şeklindedir.

Kullanılan lipazın işletme kararlılığı: Novozym 435' in işletme kararlılığını incelemek için tutuklanmış enzim tepkime sonrası süzülüp önce üzerinde birikmiş olabilecek tribütirinden ve bütirik asitten arındırmak amacıyla substrat ve ürünü çözebilecek metanol ile daha sonra da metanolü uzaklaştırmak için su ile yıkanmıştır. Oda sıcaklığında kurutulup tekrar kullanılmıştır. Bu işlem 6 kez tekrarlanmıştır. Her kesim için lipaz aktivitesi ölçülmüştür. Tepkime şartları : 20 mL tepkime hacmi, 100 mg enzim, 50 °C sıcaklık, pH 7.0, 300 rpm karıştırma hızı şeklindedir.

Organik çözücülerin etkisi: Çalışmanın bu aşamasında farklı hidrofobikliğe sahip organik çözücüler değişik oranlarda tepkime ortamına katılarak hidroliz hızı

üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kullanılan çözücüler; metanol, kloroform, benzen, hekzan, heptan ve oktan, tepkime ortamına katılma oranları ise yüzde 1 ile 10 arasında değişen değerlerdir. Tepkime şartları : 30 mL tepkime hacmi, % 1 tribütirin, 100 mg enzim, 50 °C sıcaklık, pH 7.0, 300 rpm karıştırma hızı şeklindedir.

3.5. Tribütirin Transesterleşme/İnteresterleşme Tepkimesinde Kullanılan Deneysel Yöntemler

3.5.1. Tepkime kabı

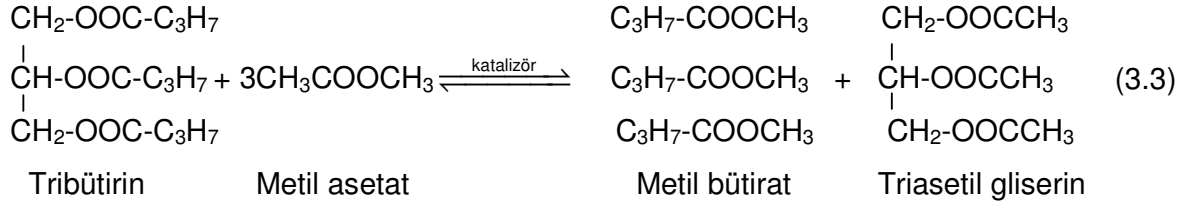
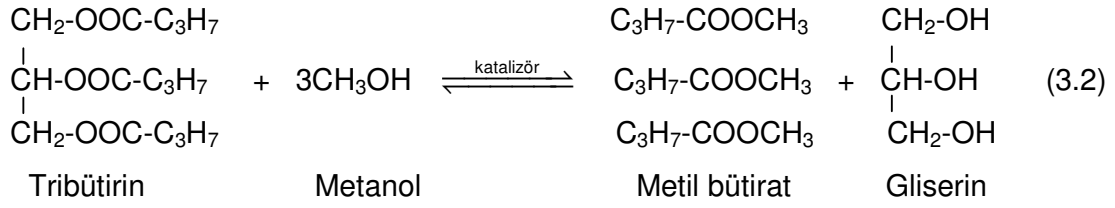
Kesikli sistem deneyleri, 10 mL hacmindeki tüplerde yürütülmüştür. Tepkime hacimleri, 2 ile 7 mL arasında değişiklik göstermektedir. Karıştırma orbital karıştırıcı ile sağlanmıştır.

Yarı-sürekli sistem deneyleri, 15 cm uzunluğunda, 1 cm çapında, yaklaşık 12 mL' lik silindir cam reaktörde yürütülmüştür. Reaktöre akışkan yatak durumunu sağlayacak miktarda enzim doldurulup döngülü ve sürekli olarak substrat çözeltisi beslenmiştir. Akış hızı peristaltik pompa yardımıyla ayarlanmıştır. Akışkan yatak sistemi, Şekil 3.2' de verilmiştir.

3.5.2. Tepkimelerin izlenmesi

Tepkime ortamı tribütirin, metanol, metil asetat ve tutuklanmış enzimden oluşmaktadır. Tepkime ürünleri, transesterleşme tepkimesi için, metil bütirat ve gliserin (bkz. Eşitlik 3.2), interesterleşme tepkimesi için, metil bütirat ve triasetil gliserindir (bkz. Eşitlik 3.3). Enzim, toplam reaktant kütlelerinin belirli yüzdelerinde ortama katılmış olup bu yüzdeler tepkime koşulları içerisinde belirtilmiştir. Ek olarak herhangi bir organik çözücü kullanılmamıştır. Burada metil asetat hem reaktant hem de çözücü görevini üstlenmektedir. Tepkime ortamının sıvı fazı homojen bir şekilde birbiri içinde çözünmektedir.

Tepkime ortamından belirli zaman aralıklarıyla 20 µL' lik örnekler alınıp metanol ile seyreltilerek HPLC ile analiz edilmiştir. HPLC kolonu olarak Hichrom C18 (10 cm×4.6 mm i.d.) ters faz kolonu, hareketli faz olarak Metanol:Su (90:10) kullanılmıştır. HPLC şartları Ek 1' de verilmiştir. Reaktantların ve ürünün, UV detektör ile 210 nm' de verdikleri absorbans değerlerine göre derişimleri hesaplanmıştır. Analiz süresi yaklaşık 10 dakikadır. Kolondan çıkış sırası, metil asetat, tribütirin ve metil bütirattır. Örnek HPLC kromatogramı Ek 2' de verilmiştir.



Şekil 3.2. Tribütirin transesterleşme/interesterleşme tepkimesinde kullanılan akışkan yatak sistemi

3.5.3. Yapılan deneyler

Metanol/Metil asetat mol oranının belirlenmesi: Tribütirinin transesterleşmesi tepkimesinde açıl alıcı olarak metanolün yanında metil asetat kullanılırken metanol ve metil asetatın hangi oranlarda tepkime ortamına ekleneceğinin belirlenmesi için metanol ve metil asetatın ayrı ayrı tribütirinle verdikleri transesterleşme /interesterleşme tepkimelerinin hızları karşılaştırılmıştır. Metanol ve metil asetatın kısıtlayıcı reaktant olması gerektiğinden fazla miktarda tribütirin kullanılmıştır. Tepkime şartları: 6 mmol tribütirin, 6 mmol metanol veya metil asetat, % 5 enzim, 25 °C şeklindedir.

Karıştırma hızının etkisi: Tribütirin transesterleşme/interesterleşme tepkimesi için optimum karıştırma hızının belirlenmesi amacıyla 100 ile 250 rpm arasında dört farklı karıştırma hızında tribütirinin dönüşümü incelenmiştir. Tepkime şartları: 5 mmol tribütirin, 15 mmol metanol-metil asetat, % 5 enzim, 25 °C şeklindedir.

Metanol-Metil asetat derişiminin etkisi: Metanol-metil asetat karışımı derişiminin etkisini incelemek amacıyla tribütirin mol sayısı 5 mmol' de sabit tutulup tribütirin/metanol-metil asetat mol oranı (1:3), (1:4), (1:5), (1:6) olarak değiştirilmiştir. Tepkime ortamına toplam reaktant miktarının % 5' i kadar enzim eklenmiştir. Tepkime şartları: 5 mmol tribütirin, 15, 20, 25, 30 mmol metanol-metil asetat, % 5 enzim, 25 °C şeklindedir.

Tribütirin derişiminin etkisi: Tribütirin derişiminin tepkime hızı üzerindeki etkisini incelemek için metanol-metil asetat derişimi 15 mmol' de sabit tutulup tribütirin/metanol metil asetat mol oranı (1:3), (2:3), (3:3), (4:3) olarak değiştirilmiştir. Tepkime ortamına toplam reaktant miktarının % 5' i kadar enzim eklenmiştir. Tepkime şartları: 15 mmol metanol-metil asetat, 5, 10, 15, 20 mmol tribütirin, % 5 enzim, 25 °C şeklindedir.

Michaelis & Menten sabitlerinin belirlenmesi: Tribütirin için Michaelis&Menten sabiti, sabit metanol-metil asetat derişiminde, tribütirinin kısıtlayıcı reaktant olduğu ve inhibisyona neden olmadığı şartlarda, farklı tribütirin derişimlerinde tepkime hızları ölçülerek belirlenmiştir. Tepkime şartları: 15 mmol metanol-metil asetat, 1, 2, 3, 5 mmol tribütirin, % 5 enzim, 25 °C şeklindedir.

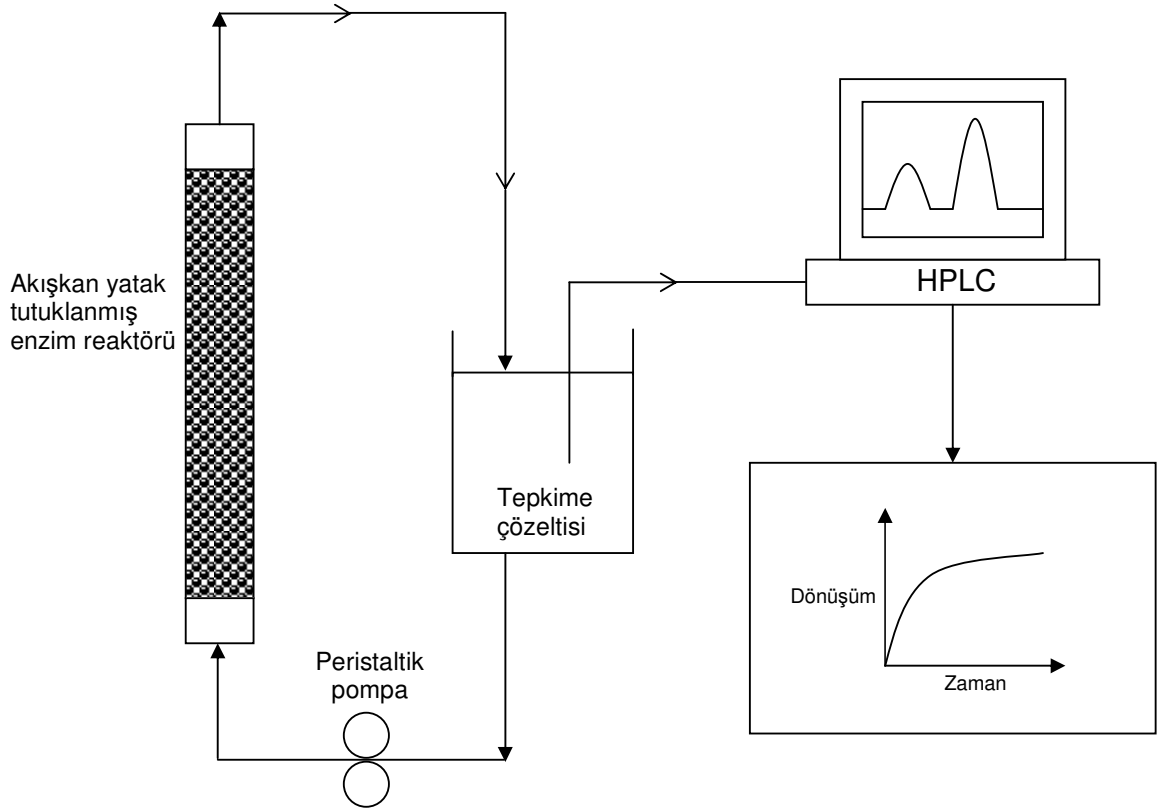
Metanol-metil asetat karışımı için Michaelis&Menten sabiti, sabit tribütirin derişiminde ve tribütirinin inhibisyona neden olmadığı şartlarda, farklı metanol-

metil asetat derişimlerinde tepkime hızları ölçülerek belirlenmiştir. Tepkime şartları: 5 mmol tribütirin, 15, 20, 25, 30 mmol metanol-metil asetat, % 5 enzim, 25 °C şeklindedir.

Tribütirin inhibisyonunun incelenmesi: Tribütirin inhibisyonunun varlığını ve türünü incelemek amacıyla sabit tribütirin derişimleri için, farklı metanol-metil asetat derişimlerinde tepkime hızları belirlenmiştir. İki farklı tribütirin derişimi için deney yapılmıştır. Tepkime şartları: 5 mmol veya 15 mmol tribütirin, 15, 20, 25, 30 mmol metanol-metil asetat, % 5 enzim, 25 °C şeklindedir.

Akışkan yatak deneyleri: Tribütirin transesterleşme/interesterleşme tepkimesinin sürekli sistemde uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla yarı-sürekli akışkan yatak sisteminde sabit substrat ve enzim derişiminde farklı akış hızlarında zamanla substrat dönüşümü izlenmiştir. Akış hızları; 5, 10, 15 ve 20 mL/dak.'dır ve peristaltik pompa yardımıyla ayarlanmıştır. Akışkan yatak sisteminin şematik gösterimi Şekil 3.3' te verilmiştir. Tepkime şartları: 0.6 mol tribütirin, 0,36 mol metanol-metil asetat (1:6 tribütirin/metanol-metil asetat mol oranı), 35 mL tepkime hacmi, 320 mg enzim (% 1), 25 °C şeklindedir.

Tepkime ürünlerinin kütle spektroskopisi ile doğrulanması: Transesterleşme ve interesterleşme tepkimeleri, reaktantların ve ürünlerin derişimleri HPLC' de analiz edilerek izlenmiştir. Ancak tepkimenin başlıca ürünü olan metil bütiratın doğrulanması için spektroskopi kullanılmıştır. Bu amaçla, tepkime başında, ortasında ve sonunda örnekler alınıp GC/MS' de analiz edilmiştir. GC/MS şartları, Ek 3' te verilmiştir. Elde edilen kromatogramlara ve GC/MS yazılımında var olan spektrum kütüphane taramasına göre tepkime ürünü metil bütirat doğrulanmıştır. Tepkimenin başında, ortasında ve sonunda alınan örneklerin analizi sonucunda elde edilen kromatogramlar, Ek 4' te sunulmuştur. Kütüphane taraması sonucu ise Ek 5' tedir.



Şekil 3.3. Akışkan yatak sisteminin şematik gösterimi

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞILMASI

Bu çalışmada yağlar için model bir substrat olan tribütirinin lipaz aracılığıyla hidroliz ve transesterleşme/interesterleşme tepkimeleri incelenmiştir. Dolayısıyla, çalışma iki kısımdan oluşmaktadır.

İlk kısımda, tribütirinin suda çözünür halde ve emülsiyon halinde hidrolizi incelenmiş, hidroliz tepkimesi için optimum pH, sıcaklık, karıştırma hızı, enzim derişimi ile Michaelis-Menten sabitleri belirlenmiştir. Tutuklanmış lipazın tekrar kullanılabilirliği, yani, işletme kararlılığı test edilmiştir. Ayrıca, tepkime ortamına belirli oranlarda katılan bazı organik çözücülerin hidroliz hızı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çalışmanın ikinci kısmında ise, tribütirinin metanol ile transesterleşme ve metil asetat ile interesterleşme tepkimesi aynı anda gerçekleştirilmiş ve metanol ile beraber metil asetat kullanımının yararları araştırılmıştır. Karıştırma hızının etkisi, metanol ve metil asetatın hangi oranlarda tepkime ortamına katılacağı, tribütirin derişiminin etkisi, metanol-metil asetat karışımı derişiminin etkisi, Michaelis-Menten ve tribütirin için inhibisyon sabitleri, kesikli sistemde yapılan deneyler sonucunda tespit edilmiştir. Tribütirinin metanol ve metil asetatla transesterleşme/interesterleşme tepkimesinin ping-pong bi-bi mekanizmasına göre davranış gösterdiği ve deney sonuçlarının bu mekanizma sonucu çıkarılan kinetik modelin sonuçlarıyla uyum sağladığı görülmüştür. Kesikli sistemde elde edilen veriler ışığında tepkimenin sürekli sistemde uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla yarı-sürekli akışkan yatakta farklı akış hızlarında dönüşüm incelenmiştir.

Bu bölümde yukarıda sözü edilen sonuçlar ayrıntılı şekilde verilecektir.

4.1. Hidroliz Tepkimesi

Tribütirin hidrolizinde, tribütirinin suda çözünür halde ve emülsiyon halinde bulunduğu durumlarda tepkime farklı şekillerde değerlendirilmektedir. Lipazların en karakteristik özelliği, hidroliz tepkimesini hidrofobik ara yüzeylerde yüksek bir etkinlikle gerçekleştirmesidir (Çelebi, 1980; Uçar, 1984). Dolayısıyla ara yüzey alanının artması tepkime hızını artırır. Trigliseritler, polar ve apolar gruplar taşımaları nedeniyle misel oluşturarak ara yüzeye yönelme eğilimindedir (Uçar, 1984). Bu da, tepkimenin ara yüzeylerde gerçekleşmesinin bir nedenidir. Ara

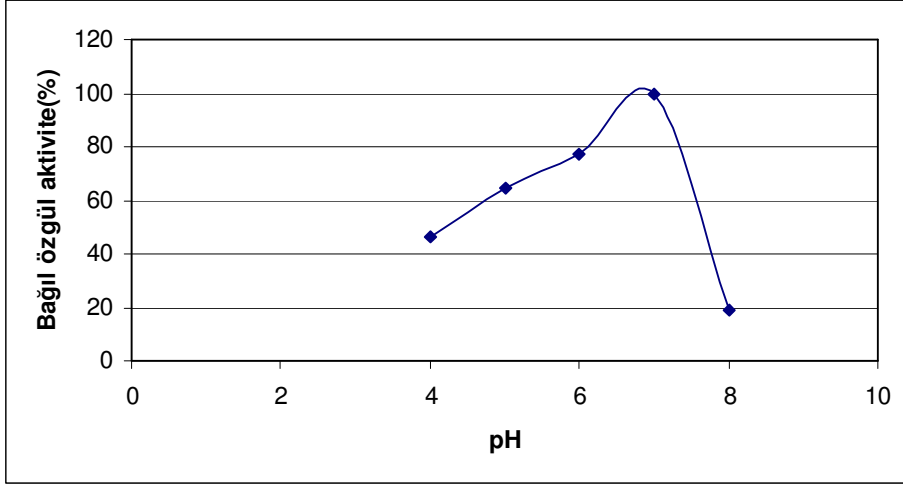
yüzey alanının arttırılması amacıyla yüzey etken maddeler kullanılmaktadır. Yüzey etken maddeler (surfactants), sıvının yüzey gerilimini düşürerek sıvı-sıvı fazları arasındaki damlacık boyutlarının azalmasına neden olur. Damlacık boyutlarının azalması, ara yüzey alanının ve sonuç olarak hidroliz hızının artmasını sağlar (Noor et al., 2003). Wu and Tsai (2004)' nin tribütirinin serbest ve tutturulmuş lipazla hidrolizini inceledikleri çalışmada, hidroliz hızı, Tween 80, Span 80, PEG200 gibi yüzey etken maddelerin tepkime ortamına eklenmesiyle çok fazla değişmemiştir. Bunun nedeni olarak da tribütirinin alkil zincirinin kısa olması ve ara yüzey alanının değişmesinin hidroliz hızı üzerindeki etkisinin az olduğu öne sürülmüştür.

Bu çalışmada ara yüzey alanının etkisini ortadan kaldırmak için birtakım deneyler tribütirinin suda çözünür olduğu durumda gerçekleştirilmiştir. Tribütirinin sudaki çözünürlüğü, oda sıcaklığında, hacimce % 0.0115' dir. Optimum pH, sıcaklık, karıştırma hızı ve enzim derişimi, bu şartlar altında belirlenmiştir.

Tribütirin hidrolizi sonucunda oluşan bütirik asit, belli bir derişimden sonra az da olsa bir inhibisyona sebep olmaktadır (Uçar, 1984). Ayrıca, yüksek substrat derişimlerinde, artan bütirik asit oluşumuyla beraber çözeltinin pH' sı düşer, çözelti asidik hale gelir. Bu da enzimin denatüre olmasına yol açar (Wu and Tsai, 2004). Bu çalışmada kullanılan sistemde, pH tepkime süresince uygun derişimde baz eklenerek sabit tutulmuştur. Böylece hem bütirik asit inhibisyonunun hem de asidik koşullarda enzim denatürasyonunun önüne geçilmiştir. Ayrıca, bu sistem kullanılarak harcanan baz hacminden oluşan bütirik asitin derişimi zamana bağlı olarak elde edilmiştir. Zamana bağlı bütirik asit derişimi verilerinden hidroliz hızına geçilmiştir. Hız değerleri, birim zamanda 1 mg tutuklanmış enzimle oluşan μmol bütirik asit şeklinde ifade edilmiştir ($\mu\text{mol BA/mg.dak}$).

4.1.1. Optimum pH' nın belirlenmesi

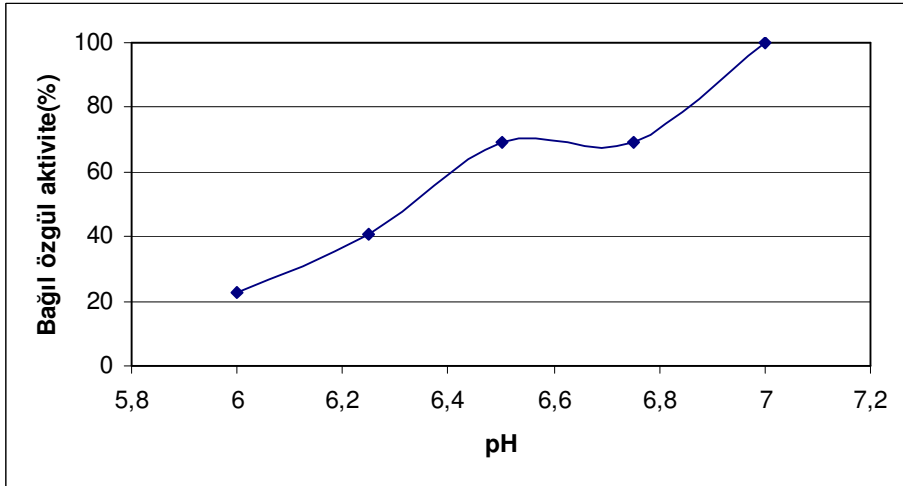
Novozym 435 ile tribütirinin hidroliz tepkimesi 4 ile 8 arasında değişen farklı pH' lardaki tampon çözeltilerde yürütülmüştür. % 0.01 tribütirin (hacimce) ve 100 mg enzim kullanılarak yapılan deneylerin sonuçları Şekil 4.1' de görülmektedir. Şeklin altında tepkime şartları belirtilmiştir. Tepkime hız ifadeleri en yüksek hızla bağlı ve yüzde olarak verilmiştir.



Şekil 4.1. Optimum pH'nın belirlenmesi-1

Tepkime şartları : 20 mL tepkime hacmi, % 0.01 tribütirin, 100 mg enzim, 40 °C sıcaklık, 400 rpm karıştırma hızı (% 100 bağıl hız = 0.0118 $\mu\text{mol/mg.dak}$)

Asidik ya da bazik koşullarda düşük hidroliz hızları elde edilmiştir. Kullanılan lipazın en uygun çalıştığı pH' lar nötre yakın pH' lar olarak bulunmuştur. pH 6.0 ile 7.0 arasındaki optimum değerlerin kesin olarak belirlenmesi için bu pH' lar arasındaki pH' lardaki tepkime ortamlarında tepkime hızları tespit edilmiştir. Şekil 4.2' ye göre en yüksek tepkime hızı pH 7.0' de elde edilmiş olup optimum çalışma pH' sı 7.0 olarak karar verilmiştir.

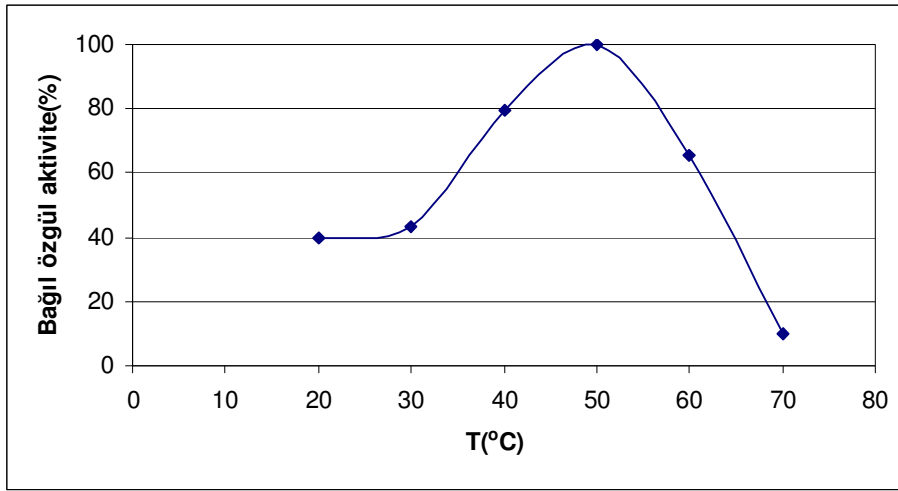


Şekil 4.2. Optimum pH'nın belirlenmesi-2

Tepkime şartları : 20 mL tepkime hacmi, % 0.01 tribütirin, 100 mg enzim, 40 °C sıcaklık, 400 rpm karıştırma hızı (% 100 bağıl hız = 0.0118 $\mu\text{mol/mg.dak}$)

4.1.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Tutuklanmış enzimlerin ısı kararlılığı, uygulamaları açısından en önemli kriterlerden biridir. Bilindiği gibi tutuklanmış enzimler çözünür formdaki enzimlere göre ısıya ve denatürasyona karşı daha dayanıklıdır. Bu yüzden optimum sıcaklık belirlenirken geniş bir aralıkta deney yapılmıştır. 20 °C ve 70 °C arasındaki sıcaklık değerlerinde lipaz aktivitelerinin değişimi Şekil 4.3' te verilmiştir. Değerler yine bağıl olarak ifade edilmiştir. Sonuç olarak en yüksek lipaz aktivitesi 50 °C' de elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

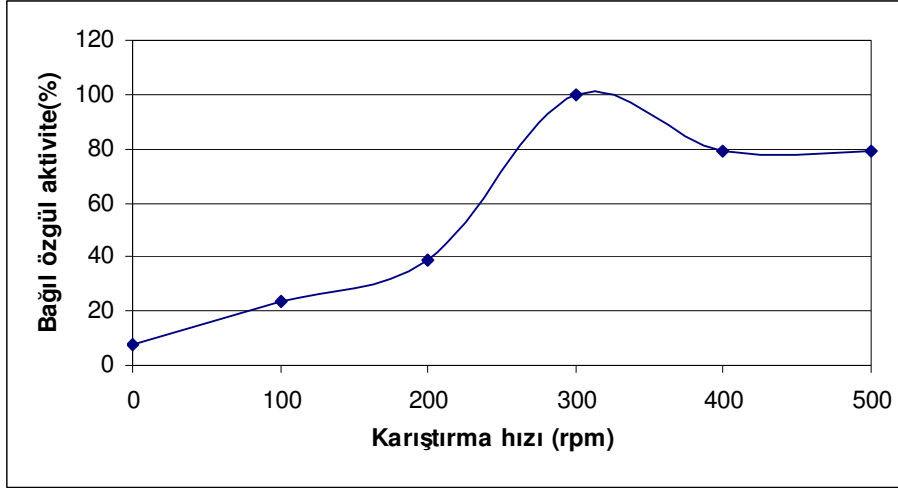
Tepkime şartları : 20 mL tepkime hacmi, % 0.01 tribütirin, 100 mg enzim, pH 7.0, 400 rpm karıştırma hızı (% 100 bağıl hız = 0.0144 μ mol/mg.dak)

Kimyasal tepkimelerde, Arrhenius Yasası'na göre, tepkime hız sabiti sıcaklıkla üssel olarak artar. Burada, 60 ve 70 °C'deki aktivite değerlerinin artması beklenirken azalması enzimin bu sıcaklıklarda aktivitesini yitirmesine bağlanmaktadır.

4.1.3. Optimum karıştırma hızının belirlenmesi

Karıştırma hızı 0 ile 500 rpm arasında değiştirilerek enzim aktivitesi ölçülmüştür. Lipaz aktivitesi karıştırma hızı arttıkça artmıştır. Bunun nedeni enzim partiküllerinin ortama homojen olarak dağılmasıdır. Katı-sıvı tepkime sistemlerinde kütle aktarım dirençleri ihmal edilebilir, yani tepkime, tepkime kontrollü olarak gerçekleşir. Şekil

4.4' e göre aktivite 300 rpm' e kadar artmış bundan sonra ise pek değişmemiştir. Bu noktadan sonra kütle aktarım dirençleri sabit bir değerdedir. Optimum karıştırma hızı olarak 300 rpm seçilmiştir.



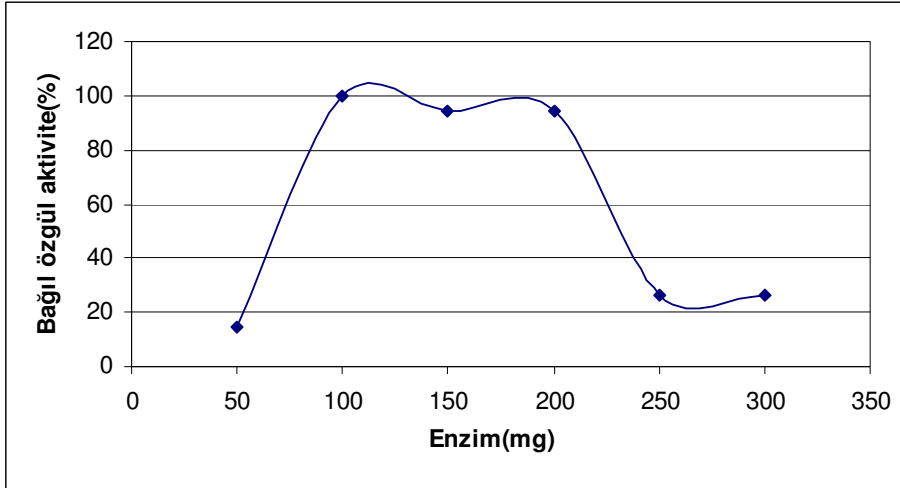
Şekil 4.4. Optimum karıştırma hızının belirlenmesi

Tepkime şartları : 20 mL tepkime hacmi, % 0.01 tribütirin, 100 mg enzim, pH 7.0, 50 °C sıcaklık (% 100 bağıl hız = 0.018 µmol/mg.dak)

Tepkime emülsiyon ortamında yürütülseydi karıştırma hızı ara yüzey alanını değiştirecek, bu da tepkime hızını etkileyecekti. Ancak deneyler tribütirinin tamamen çözünür olduğu derişim aralığında gerçekleştirilmiştir. 400 ve 500 rpm karıştırma hızında aktivitedeki azalma, sıvı fazda oluşan kabarcıklardan kaynaklandığı önerilmektedir.

4.1.4. Optimum enzim derişiminin belirlenmesi

Optimum enzim derişiminin belirlenmesi için 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 mg enzimin 30 mL tepkime ortamında gösterdiği aktiviteler saptanmıştır (Şekil 4.5). Bu deneyin amacı, en ekonomik enzim miktarının belirlenmesidir. Yapılan deneylerin sonucunda bu sorunun yanıtı alınmıştır. Şöyle ki, 100 mg enzim miktarından sonra aktivite hemen hemen sabit kalmış, 250 mg' dan sonra azalmaya başlamıştır. Bu azalmaya, 250 mg enzim miktarından sonra tutuklanmış enzim partiküllerinin, dış kütle aktarımını zorlaştırmasının neden olduğu düşünülmektedir. 100 mg tutuklanmış enzim/30 mL tepkime hacmi optimum enzim derişimi olarak belirlenmiştir.

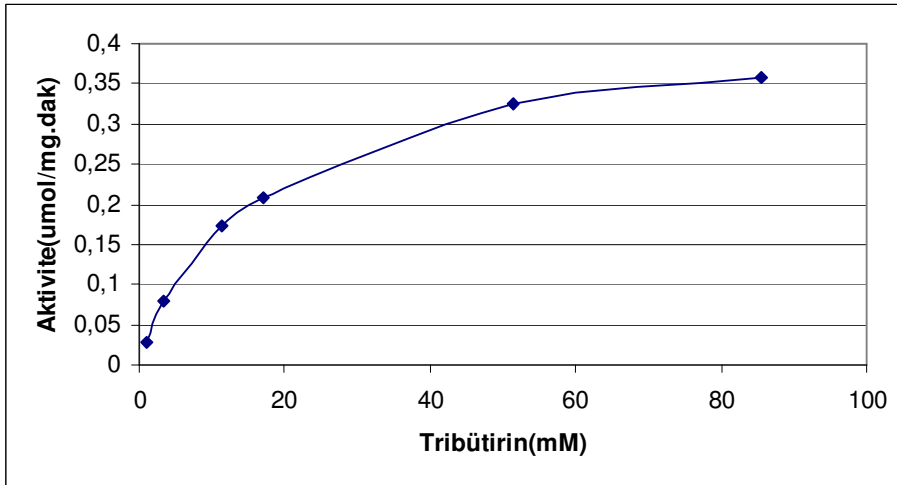


Şekil 4.5. Optimum enzim miktarının belirlenmesi

Tepkime şartları : 30 mL tepkime hacmi, % 0.01 tribütirin, pH 7.0, 50 °C sıcaklık, 300 rpm karıştırma hızı (% 100 bağıl hız = 0.01803 μ mol/mg.dak)

4.1.5. Michaelis & Menten sabitlerinin belirlenmesi

Özgül aktivite ve substrat derişimi arasındaki ilişki Şekil 4.6' da verilmiştir. Özgül aktivite substrat derişimi arttıkça artmıştır ve bu ilişki Michaelis&Menten kinetiğine uyum göstermektedir.



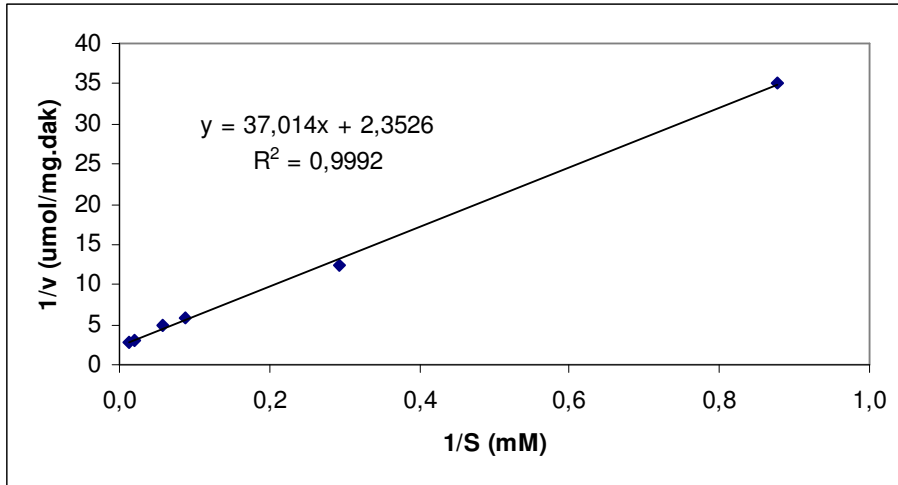
Şekil 4.6. Tribütirin derişimine karşı özgül aktivite grafiği

Tepkime şartları : 20 mL tepkime hacmi, pH 7.0, 50 °C sıcaklık, 300 rpm karıştırma hızı

Substrat derişimi ile özgül aktivite değerleri belirlenirken tribütirinin hem çözünür halde hem de emülsiyon halinde olduğu derişimleri kullanılmıştır. İki durumda da aktivite, Michaelis&Menten kinetiğine uygun davranış göstermiştir.

Emülsiyon ortamında substrat derişimi olarak ara yüzey substrat derişimi alınmasının daha doğru olduğu düşünölmektedir. Ara yüzey derişimi, damlacık çapıyla ters orantılı olarak artar (Çelebi, 1980). Karıştırma hızı arttikça damlacık çapı azaldığından ara yüzeydeki substrat derişimi de artar. Karıştırma hızının mümkün olduğunca yüksek, dış kütle aktarımı kısıtlamalarının ise minimum ve sabit bir değerde olduğu varsayılırsa substrat derişiminin teorik değeri ile ara yüzeydeki değeri arasındaki fark ihmal edilebilir.

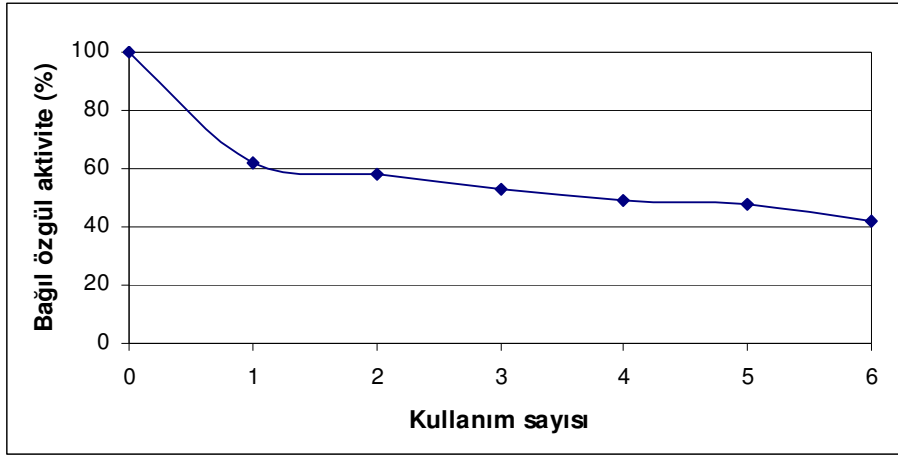
Michaelis&Menten sabitleri farklı substrat derişimlerindeki özgül aktivite değerleri Lineweaver-Burk grafiğine geçirilerek belirlenmiştir (şekil 4.7). Grafiğe göre, V_m değeri, $0.425 \mu\text{mol BA}/(\text{mg E.dak})$, K_m değeri ise, 15.736 mM olarak saptanmıştır. Buradaki K_m değeri, emülsiyon durumu için belirlendiğinden, görönen K_m değeri demek daha doğru olacaktır. K_m sabiti, enzimin substrata olan ilgisini (afinitesini) belirleyen bir parametredir. Düşük K_m değerleri, enzimin substrata olan ilgisinin yüksek olduğunu gösterir.



şekil 4.7. Michaelis&Menten sabitlerinin belirlenmesi-Lineweaver-Burk grafiği

4.1.6. Kullanılan lipazın işletme kararlılığı

Novozym 435' in işletme kararlılığını incelemek için tutuklanmış enzim tepkime sonrası süzülüp tekrar aynı tepkime şartlarında kullanılmıştır. Şekil 4.8' e göre enzim aktivitesi 6 kullanım sonrasında yaklaşık % 60 oranında düşmüştür. Böylece tutuklanmış bir enzim olan Novozym 435' in tekrar tekrar kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.



Şekil 4.8. Enzimin işletme kararlılığı

Tepkime şartları : 20 mL tepkime hacmi, pH 7.0, 50 °C sıcaklık, 300 rpm karıştırma hızı

Enzim molekülünün yapısındaki değişimler aktivite kaybına neden olur. Enzim derişimine birinci dereceden bağlı sistemlerde, aktif bölge derişimi zamanla azalır. pH ve sıcaklığın yol açtığı aktivite kaybı bu türdendir. Çünkü, enzimin özgül ve aktif olmasını sağlayan sarmal yapı işletme koşullarında bozulabilir ve enzimin katalitik özellikleri zamanla kaybolur (Bailey and Ollis, 1986).

4.1.7. Organik çözücülerin hidroliz hızına etkileri

Sulu ve iki fazlı sistemlerde yürütülen hidroliz tepkimeleri, ters miseller, mikro-sulu organik çözücüler ve süperkritik akışkanlar gibi yeni tepkime ortamlarında gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Örneğin, esterlerin hidrolizinde sitokiyometrik oranlarda su içeren organik çözücü kullanımı, hidrofobik substratların organik fazdaki yüksek çözünürlükleri ve yığın organik fazda çözünen tepkime ürünleri

alkol ve asitin enzim inhibisyonuna etkisinin azalması nedeniyle birçok yarar sağlar (Yadav and Devi, 2004).

Çalışmanın bu aşamasında farklı hidrofobikliğe sahip organik çözücüler değişik oranlarda tepkime ortamına katılarak hız üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kullanılan çözücüler ve hidrofobiklik¹ değerleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Bazı organik çözücülerin hidrofobiklik (log P) değerleri

Çözücü	Log P
Metanol	-0.74
Kloroform	1.97
Benzen	2.13
Hekzan	4.00
Heptan	4.50
Oktan	5.15

Kaynak : CRC Handbook of Chemistry and Physics

0 ile 10 arasındaki yüzdelerde tepkime ortamına katılan organik çözücülerle yapılan deneylerde tepkime hızının organik çözücü olmayan koşulda ölçülen hıza göre daha düşük olduğu görülmüştür. Sonuçlar, Çizelge 4.2' de ve Şekil 4.9' da verilmiştir.

Yadav and Devi (2004), tetrahidrofurfuril bütiratın Novozym 435 aracılığıyla hidrolizini organik çözücü içeren sulu ortamda incelemiş, organik çözücülerin hidrofobiklik değerleri ile hidroliz başlangıç hızları arasında bir bağıntı elde edememişlerdir. Bu çalışmada da hidrofobiklik ve tepkime hızı arasında doğrudan bir ilişkinin olmadığı görülmüştür. Yadav and Devi (2004)' nin yaptığı çalışmada sitokiyometrik oranlarda su bulunan tepkime ortamına katılan organik çözücüler, başlangıç tepkime hızını artırmıştır. Ancak, toplam dönüşümler çok düşüktür (% 19-45 arası). En yüksek başlangıç hızı, heptanla elde edilmiştir. Suyla karışmayan çözücü kullanılmasının nedeni, katalizörün organik çözücü ile temasını mümkün olduğunca azaltmaktır. Şöyle ki, organik çözücünün sudaki çözünürlüğünün artmasıyla tepkime inhibisyonu ve katalizörün aktivitesini yitirme olasılığı artmaktadır.

¹Hidrofobiklik, çözücünün, dengede olan 1-oktanol/su sisteminde dağılım katsayısının (P) logaritmasıdır. Genellikle, P, apolar yapılarda yüksek, polar yapılarda düşüktür.

Hidroliz tepkimelerinde suyun iki rolü vardır; tepkimede substrat olarak rol almak ve lipazın işlevselliğini sağlamak. Su, enzimin yapısal esnekliğini sağlayarak sulu-organik çözeltilerde enzim aktivitesini artırır. Fakat, belirli bir su miktarı geçildiğinde tepkime hızında bir azalma görülmektedir. Bu derişimlerde, suyun substrattan çok inhibitör görevini üstlendiği anlaşılmaktadır. Daha çok su eklenmesi, enzim etrafındaki su tabakasını kalınlaştırır ve difüzyon problemleri ortaya çıkar (Yadav and Devi, 2004).

Çizelge 4.2. Organik çözücülerin hidroliz hızına etkileri

Metanol(%)	Hız($\mu\text{mol/mg.dak}$)	Bağıl hız(%)
0	0,14794	100,0
1	0,144969	98,0
3	0,14267	96,4
5	0,07314	49,4
10	0,04822	32,6

Kloroform(%)	Hız($\mu\text{mol/mg.dak}$)	Bağıl hız(%)
0	0,14794	100,0
1	0,077833	52,6
3	0,07287	49,3
5	0,006072	4,1

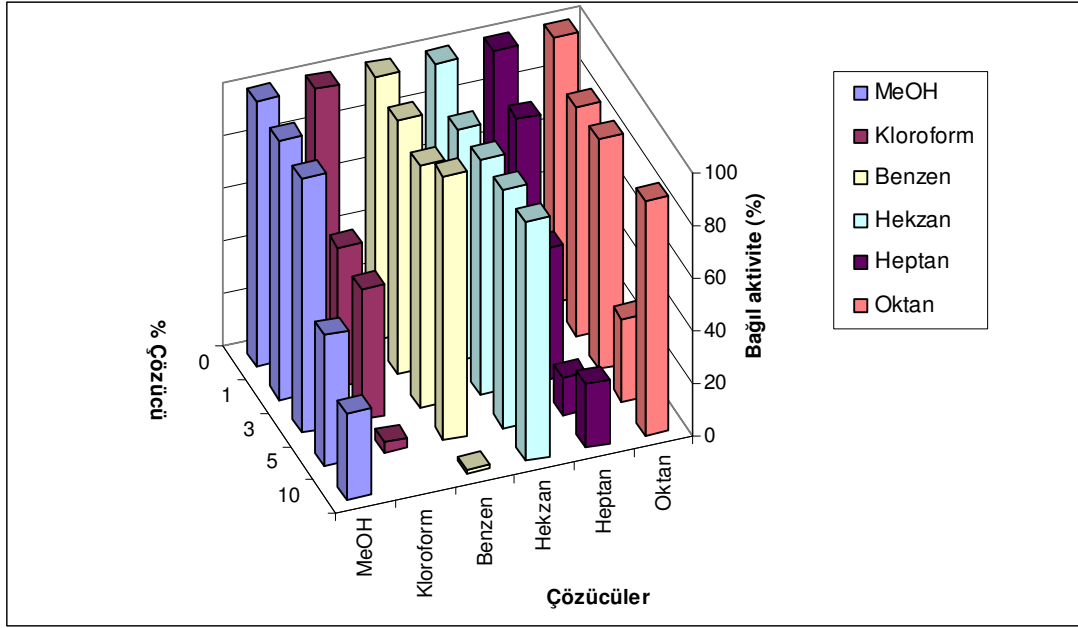
Benzen(%)	Hız($\mu\text{mol/mg.dak}$)	Bağıl hız(%)
0	0,14794	100,0
1	0,142144	96,1
3	0,135665	91,7
5	0,14772	99,9
10	0,002108	1,4

Hekzan(%)	Hız($\mu\text{mol/mg.dak}$)	Bağıl hız(%)
0	0,14794	100,0
1	0,129326	87,4
3	0,131489	88,9
5	0,133186	90,0
10	0,13403	90,6

Heptan(%)	Hız($\mu\text{mol/mg.dak}$)	Bağıl hız(%)
0	0,14794	100,0
1	0,128238	86,7
3	0,073904	50,0
5	0,020843	14,1
10	0,035845	24,2

Oktan(%)	Hız($\mu\text{mol/mg.dak}$)	Bağıl hız(%)
0	0,14794	100,0
1	0,128034	86,5
3	0,128723	87,0
5	0,046594	31,5
10	0,130897	88,5

Hidrofilik çözücülerin (metanol, kloroform), enzim etrafındaki suyu hapsetme özelliklerinden dolayı enzimin üç boyutlu yapısında değişikliklere neden olarak aktiviteyi düşürdüğü, hidrofobik çözücülerin (benzen, hekzan, heptan, oktan) ise substratın suya göre hidrofobik çözücülerde daha çok çözünmesi nedeniyle enzimle substrat arasında difüzyon kısıtlamalarını artırdığı ve ara yüzeydeki substrat derişimini düşürdüğü düşünülmektedir.



Şekil 4.9. Organik çözücülerin hidroliz hızına etkileri
Tepkime şartları : 30 mL tepkime hacmi, % 1 tribütirin, pH 7.0, 50 °C sıcaklık, 300 rpm karıştırma hızı

4.2. Transesterleşme/İnteresterleşme Tepkimesi

Bu çalışmada yağların metanol ile transesterleşme tepkimesi üzerinde durulmuştur. Bu tepkimeye metanoliz, transesterleşme başka bir alkolle yapılırsa alkoliz adı verilir. Transesterleşmede kullanılan alkoller, metanol, etanol, propanol, butanol ve amil alkoldür. Metanol ve etanol en çok kullanılanlardır. Özellikle metanolün fiyatı çok düşüktür. Metanoliz tepkimelerinin başlıca önemi, yağlardan metil ester oluşturmalarıdır. Metil esterler, biyodizel amaçlı kullanılmaktadır. Transesterleşme ile trigliseritlerin viskozitesini düşürmek ve yakıtın fiziksel özelliklerini geliştirmek amaçlanmaktadır (Fukuda et al., 2001).

Enzimle katalize edilen metanoliz tepkimelerinde bazı sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bunların başında metanol inhibisyonu gelir. Metil ester verimini artırmak için fazla miktarda metanol kullanılması gerekmektedir. Böylece ortamdaki yağın tümünün metil estere dönüştürülmesi hedeflenmektedir. Buna karşın metanolün yağ ile sitokiyometrik oranda veya daha az oranlarda bile kullanıldığı durumlarda metanol inhibisyonu ile karşı karşıya kalınmaktadır. Metanol/yağ mol oranı, (1.5:1.0) (Fukuda et al., 2001) veya (1:1) (Kaieda et al., 2001; Nie et al., 2006) değerinin üstünde kullanıldığında enzim aktivitesini yitirmektedir. Metanolün fazlası yağın içinde damlacıklar halinde kalır. Enzim, yağın içinde çözünmeyen metanol molekülleriyle karşılaşır inaktive olabilir; çünkü, metanol enzimin üç boyutlu yapısını bozar. Bu yüzden, literatürde lipazla katalize edilen metanoliz tepkimelerinde metanolün tamamen çözünmesi gerektiği vurgulanmaktadır.

Metanol inhibisyonundan kaynaklanan enzim deaktivasyonunun önüne geçmek için bazı yöntemler geliştirilmiştir. Örneğin, Fukuda et al. (2001), Nie et al. (2006) ve Shimada et al. (1999), metanolü aşamalı olarak tepkime ortamına ekleyerek lipazın deaktivasyonunu önlemişlerdir. Bu şekilde uzun tepkime süresi (48 saat) sonunda % 99'a varan dönüşümler elde edilmiştir. Başka bir çalışmada, metanol, yağ ile sitokiyometrik oranda (metanol/yağ:(4/1)) kullanılmış ve 7 saat sonunda yaklaşık % 90 dönüşüm elde edilmiştir. Buradaki olumsuz nokta, yüksek miktarda enzim kullanılmasıdır (100 g yağ için 30 g enzim). Ayrıca, bu çalışmada, birincil alkollerin karbon sayıları arttıkça metil ester dönüşümü azalmış, en yüksek verim izoamil alkolle elde edilmiştir (Köse et al., 2002).

Başka bir yöntem ise, tepkime ortamına belirli oranlarda su katılmasıdır. Kaieda et al. (2001)' in çalışmasında, su, lipazın metanol ile aktivitesini kaybetmesini önlemiştir. Metanoliz, hidroliz ve esterleşme tepkimelerinin hızları karşılaştırıldığında, hidroliz hızının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle yüksek su oranlarında, tepkime hidroliz tarafına kaymakta ve transesterleşme verimi düşmektedir. Sabit metanol miktarı için su oranı azaldıkça metanoliz hızı artmıştır. Su kullanılarak metanol/yağ oranı 2 ve 3'e kadar artırılmış ve yüksek metil ester verimi elde edilmiştir. Nie et al. (2006)' in çalışmasında ise, suyun etkisi incelenirken yağ ağırlığının % 0 ile 40' ı kadar su kullanılmış, su miktarı arttıkça metil ester verimi belli bir değere kadar artmıştır. % 10-15 su oranından sonra

dönüşüm azalmıştır. Bunun nedeni, yine, düşük su aktivitesinde esterleşme, yüksek su aktivitesinde ise hidroliz tepkimesinin baskın olmasıdır.

Metanoliz tepkimelerinde karşılaşılan bir diğer sorun da tepkimenin yan ürünü olan gliserindir. Tepkime süresince ortaya çıkan gliserin, enzim etrafında birikerek substrat ve ürün difüzyonunu kısıtlayarak tepkimeyi inhibe eder. Yağda ve organik çözücülerde çözünmeyen gliserin, silika jel veya diğer yüzeye tutucu (adsorbent) maddeler kullanılarak uzaklaştırılmaktadır (Soumanou and Bornscheuer, 2003; Stevenson et al., 1994).

Başka bir çalışmada, sürekli sistemde tutuklanmış enzimle doldurulmuş sabit yatakta ayçiçek yağının, butanol ile transesterleşme tepkimesi incelenmiştir. Başlangıçta elde edilen % 95' lik dönüşüm, gliserinin enzimin yüzeyine tutunmasından dolayı 14 saat sonunda % 10' un altına kadar düşmüştür. Deney sonunda enzim, gliserin desorpsiyonu için suyla yıkandığında, enzim ağırlığının % 73' ü kadar gliserinin enzimin yüzeyine tutunduğu tespit edilmiştir. Aynı işletme koşullarında, enzim miktarının artması, dönüşümün düşmeye başlama süresini geciktirmiştir. Örneğin, 500 mg enzimle 5 saat sonra, 2 g enzimle 20 saat sonra dönüşüm azalmaya başlamıştır. Zamanla dönüşümün azalmasının nedeni olarak, yüzeye tutunan gliserin moleküllerinin enzimin etrafında hidrofilik bir bariyer oluşturması sonucu hidrofobik substratların (trigliseritler) difüzyonunu kısıtladığı öne sürülmüştür. Aktivitenin geri kazanılması için bazı yöntemler araştırılmıştır. Bunlardan birincisi, sürekli dolgulu reaktörde silika jel kullanılmasıdır. Bu yöntemle, gliserin, hem enzimde hem de silikada birikmiş, aktivite düşüşü biraz olsun geciktirilmiştir. İkinci yöntem, ortamın polaritesini artırmak için hidrofobik çözücünün yanında polar bir çözücünün kullanılmasıdır. Bu amaçla tepkime çözücüsü olan hekzanın yanında aseton kullanılarak gliserinin çözünürlüğü artırılmış ve dönüşüm sabit bir değerde tutulmuştur. Ancak tepkime hızı, hekzanda elde edilen en yüksek tepkime hızının üçte birine inmiştir. Üçüncü yöntem olarak da proses sırasında enzim desteğinin yıkanması ve tekrar prosesin sürdürülmesi önerilmiştir. Tutunan gliserin, dönüşüm % 50' ye kadar düştükten sonra yatak 30 dakika süreyle *t*-butanol çözeltisiyle yıkanarak yüzeyden ayrılmıştır. Yatak yıkandıktan sonra tekrar substrat çözeltisi beslenmiş ve başlangıçta % 95 dönüşüm elde edilmiştir. Bu yolla 48 saat sonunda % 80' den fazla dönüşüm gerçekleşmiştir (Dossat et al., 1999).

Metanoliz tepkimeleri genellikle organik çözücü ortamlarında yürütülmektedir. Kullanılan başlıca çözücüler; heptan, 1,4-dioksan, izooktan, sikloheksan, toluen, hekzan ve petrol eteridir (Dossat et al., 1999; Nie et al., 2006; Soumanou and Bornscheuer, 2003; Yadav and Trivedi, 2003). Çalışmalarda farklı hidrofobikliğe sahip çözücüler denenmektedir. Bilindiği gibi log P değeri, 2' den düşük olan çözücüler biyokatalizleme için uygun değildir. Bu çözücüler, enzimin etrafındaki suyu hapsedebilir. Bu da enzimin aktif yapısını etkiler. Apolar çözücüler, örneğin hekzan (log P=3.5), enzimin çevresindeki suyu ortadan kaldıramaz (Nie et al., 2006). Polar çözücüler kullanıldığında, bunlar hidrojen bağlarını ve hidrofobik etkileşimleri zarara uğratarak enzimin doğal yapısını bozar (Soumanou and Bornscheuer, 2003). Hekzan gibi hidrofobik çözücüler, yüksek enzim aktivitesi ve kararlılığı nedeniyle tercih edilirken, substrat ya da ürünün hidrofilik olduğu durumlarda, bu tip tepkime ortamlarında karışmadıkları için ortaya çıkan çözünme problemleri, polar moleküllerin hidrofilik enzim desteği üzerine tutunmasına ve böylece çok düşük tepkime hızlarına neden olmaktadır (Balcao et al., 1996; Castillo et al., 1997).

Tranesterleşme tepkimelerinde organik çözücü kullanımının yanı sıra son yıllarda çözücü içermeyen sistemlerle çalışılmaktadır. Tepkime süresini azaltmak ve organik çözücülerden kaynaklanan maliyeti ortadan kaldırmak için çözücsüz sistemler tercih edilmektedir. Ayrıca, bu sistemlerde tepkime hacimleri de oldukça azalır. Buna karşın, organik çözücü içeren sistemlerde karşılaşılan problemler burada da söz konusudur (Köse et al., 2002; Soumanou and Bornscheuer, 2003).

Yağlardan metil ester üretmede kullanılan başka bir yöntem ise, interesterleşme tepkimesidir. İnteresterleşme tepkimesinin tranesterleşmeden farkı, trigliseritten gelen açil (COOR) grubunu alan reaktantın alkol değil ester olmasıdır. Du et al. (2004)' ın yaptığı çalışmada, açil kabul edici olarak metil asetat kullanılmıştır. Metil asetat/yağ oranı (12:1) olduğu durumda dahi enzim aktivasyonunda bir düşüş görülmeden % 92' lik bir metil ester verimi elde edilmiştir. Yüksek metil asetat derişimi, ortamı seyrelttiği için yağların enzimi inhibe etmesini engellediği belirtilmiştir. Tepkimenin yan ürünü olan triasetil gliserin, gliserin gibi enzimin aktif bölgesini tıkayıp aktivite ve kararlılığa negatif etki yapmamaktadır. Enzim gliserinde olduğu gibi ek bir muamele gerektirmeden tekrar tekrar kullanılabilir. Metil asetatla interesterleşme hızı, metanolla tranesterleşme hızına göre düşük

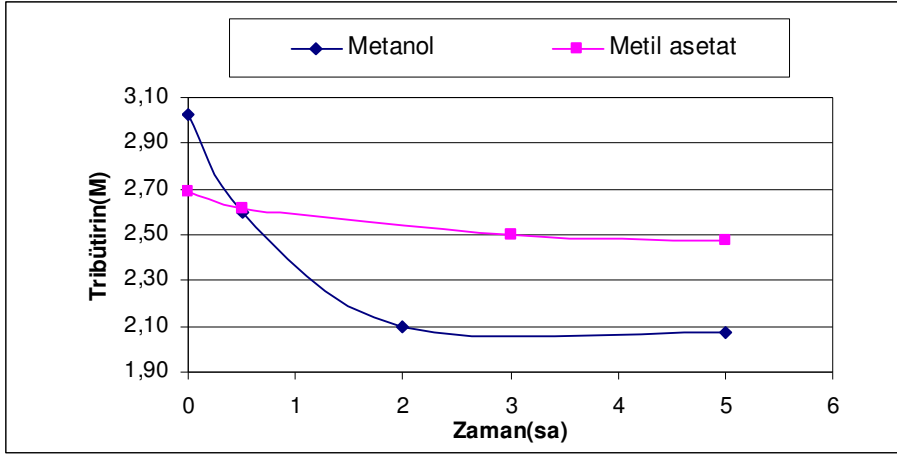
olduğu için interesterleşme tepkimesinde yüksek miktarlarda enzim kullanılması gerekmektedir (100 g yağ için 30 g enzim). Ayrıca, metil asetat, metanole göre daha pahalı bir kimyasaldır.

Bu çalışmada, yukarıda sözü edilen problemler ve çalışmalar ışığında, metanol inhibisyonunun ve gliserinden dolayı aktivite kaybının olmadığı, az miktarda enzimle kısa sürede yüksek metil ester veriminin elde edildiği, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin en aza indirildiği ve sanayiye uygulanabilir bir tepkime sistemi önerilmiştir.

Tribütirinin metanol ile transesterleşme ve metil asetat ile interesterleşme tepkimesi aynı anda gerçekleştirilmiştir. Tepkime ortamında herhangi bir organik çözücü kullanılmamıştır. Metil asetat ile hem metanolün neden olduğu inhibisyonun önüne geçilip yüksek oranlarda metanol kullanımına imkan tanınmış hem de tepkimede ikinci bir reaktant kullanılarak tribütirinin dönüşümü artmıştır. Metil asetat, yağ içinde çözüldüğü ve metanol ile karıştığı için metanolün yağdaki çözünürlüğünü artırmıştır. Daha önce belirtildiği gibi, inhibisyona neden olan, yağ içinde çözünmeyen metanol molekülleridir. % 100 fazla miktarda metanol-metil asetat karışımı, herhangi bir inhibisyona neden olmamıştır. Ayrıca, fazla miktardaki metanol, oluşan gliserini çözdüğü için gliserinin enzim yüzeyine birikmesi de ortadan kalkmıştır. Hız değerleri, birim zamanda 1 g enzimle üretilen metil bütiratın derişimi olarak ifade edilmiştir (mol/L.dak.g enzim).

4.2.1. Metanol/metil asetat mol oranının belirlenmesi

Tribütirinin transesterleşmesi tepkimesinde açıl alıcı olarak metanolün yanında metil asetat kullanılırken metanol ve metil asetatın hangi oranlarda tepkime ortamına ekleneceğinin belirlenmesi için metanol ve metil asetatın ayrı ayrı tribütirinle verdikleri transesterleşme (metanol ile) ve interesterleşme (metil asetat ile) tepkimelerinin hızları karşılaştırılmıştır. Metanol ve metil asetatın kısıtlayıcı reaktant olması gerektiğinden fazla miktarda tribütirin kullanılmıştır. Şekil 4.10' da iki tepkimedeki tribütirin derişiminin zamana bağlı olarak değişimi gösterilmektedir.



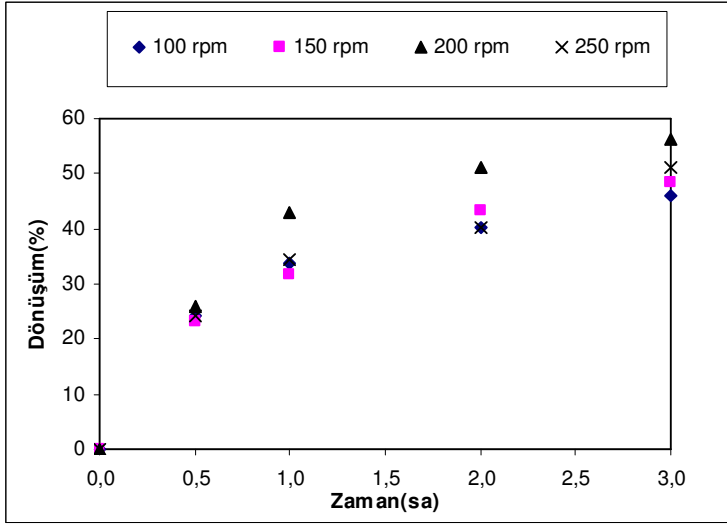
Şekil 4.10. Metanol/metil asetat oranının belirlenmesi

Tepkime şartları : 6 mmol tribütirin, 6 mmol metanol veya metil asetat, % 5 enzim, 25 °C, 150 rpm karıştırma hızı.

Grafikten de anlaşılacağı gibi metanolle transesterleşme tepkimesinin hızı, metil asetata göre daha yüksektir. Başlangıç tepkime hızlarının oranı 5 olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle, bundan sonraki transesterleşme/interesterleşme tepkimelerinde 5 mol metanol/1 mol metil asetat oranında metanol-metil asetat karışımı kullanılmıştır.

4.2.2. Karıştırma hızının etkisi

Reaktantlar için dış kütle aktarım direncinin etkisini incelemek amacıyla 4 farklı karıştırma hızında, 100, 150, 200 ve 250 rpm' de, çalışılmıştır. Hız 100 rpm' den 200 rpm' e çıkarıldığında tribütirin dönüşümü, % 46' dan 56' ya yükselmiştir. Ancak hız 250 rpm' e çıkartıldığında dönüşüm % 51' e düşmüştür. Bunun nedeni, kayma geriliminden ya da köpük oluşumundan dolayı enzimin aktivitesinin düşmesi şeklinde yorumlanmaktadır. Şekil 4.11' de farklı karıştırma hızlarında dönüşümler gösterilmektedir. Bundan sonraki deneyler 200 rpm' de gerçekleştirilmiştir.

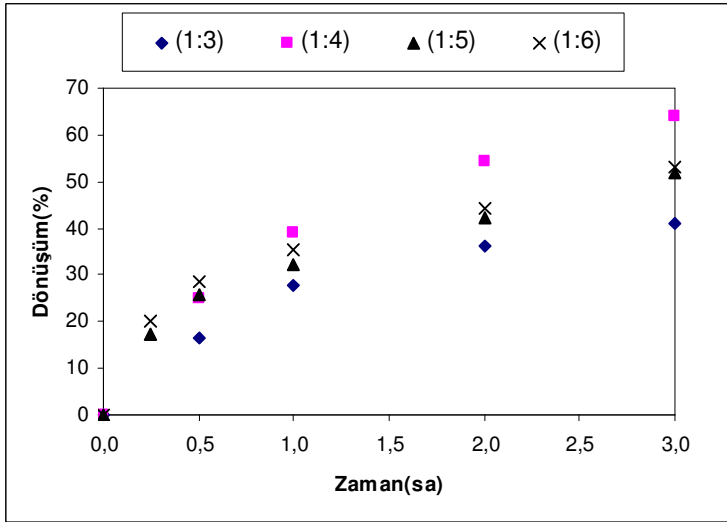


Şekil 4.11. Karıştırma hızının etkisi

Tepkime şartları : 5 mmol tribütirin, 15 mmol metanol-metil asetat, % 5 enzim, 25 °C.

4.2.3. Metanol-metil asetat derişiminin etkisi

Metanol-metil asetat karışımı derişiminin etkisini incelemek amacıyla tribütirin mol sayısı 5 mmol' de sabit tutulup tribütirin/metanol-metil asetat mol oranı (1:3), (1:4), (1:5), (1:6) olarak değiştirilmiştir. Tepkime ortamına toplam reaktant miktarının % 5' i kadar enzim eklenmiştir.



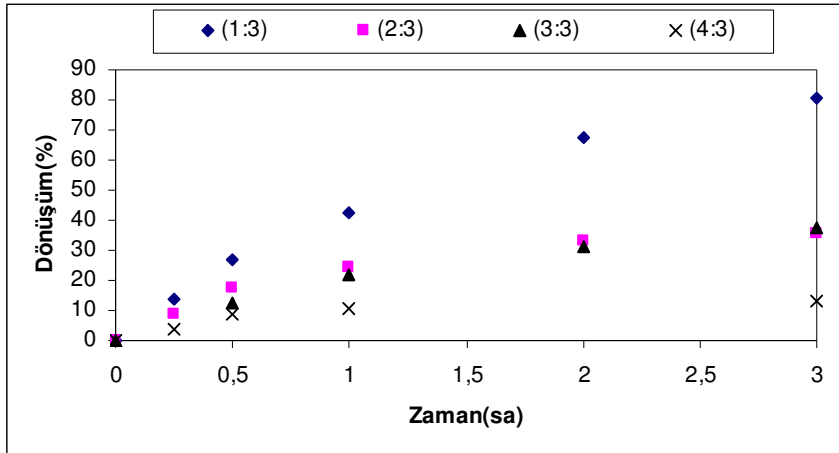
Şekil 4.12. Metanol-metil asetat derişiminin etkisi

Tepkime şartları : 5 mmol tribütirin, 15, 20, 25, 30 mmol metanol-metil asetat, % 5 enzim, 25 °C, 200 rpm karıştırma hızı.

Şekil 4.12' de farklı metanol-metil asetat derişimleri için zamanla dönüşümler verilmiştir. Derişim arttıkça başlangıç tepkime hızı artmıştır. Herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir. Bu deneyler sonucunda, % 100 fazla miktarda (1:6 mol oranında) metanol-metil asetat karışımı kullanımının enzim aktivitesinde negatif bir etki yapmadığı kanıtlanmıştır. Fazla miktarda metanol-metil asetat kullanıldığı takdirde tribütirin, kısıtlayıcı reaktant olmasından dolayı tamamen tükenecektir. Bu da istenilen bir durumdur.

4.2.4. Tribütirin derişiminin etkisi

Tribütirin derişiminin tepkime hızı üzerindeki etkisini incelemek için metanol-metil asetat derişimi 15 mmol' de sabit tutulup tribütirin/metanol-metil asetat mol oranı (1:3), (2:3), (3:3), (4:3) olarak değiştirilmiştir. Tepkime ortamına toplam reaktant miktarının % 5' i kadar enzim eklenmiştir. Şekil 4.13' te farklı tribütirin derişimleri için zamanla dönüşümler verilmiştir. Derişim arttıkça başlangıç tepkime hızı azalmıştır. Dolayısıyla tribütirin yüksek derişimlerde inhibisyona neden olmaktadır.



Şekil 4.13. Tribütirin derişiminin etkisi

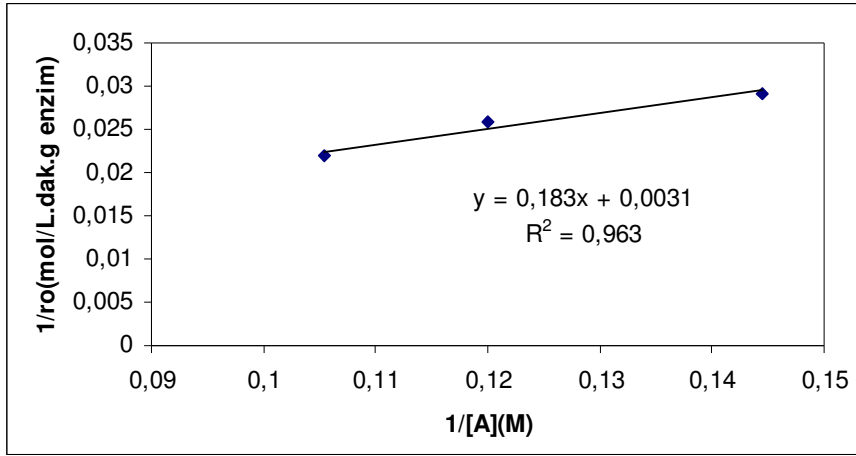
Tepkime şartları : 15 mmol metanol-metil asetat, 5, 10, 15, 20 mmol tribütirin, % 5 enzim, 25 °C, 200 rpm karıştırma hızı.

Tribütirin derişimi, sitokiyometrik oranın (1:3 mol oranı) üzerinde kullanıldığı durumda, enzim aktivitesini düşürmektedir. Transesterleşme tepkimelerinin uygulama amacı, yağın mümkün olduğunca dönüşümü ve metil ester veriminin artırılması olduğundan yağın fazla miktarda kullanımı genellikle söz konusu değildir. Dolayısıyla bu durum, pratikte bir sorun teşkil etmemektedir.

Burada elde edilen sonuca dayanarak fazla miktarda metil asetat-metanol kullanıldığında tepkime hızının artmasının nedeni olarak metanol-metil asetat karışımının ortamı seyrelterek yağın enzimi inhibe etmesini engellemesi gösterilebilir.

4.2.5. Michaelis & Menten sabitlerinin belirlenmesi

Farklı substrat derişimlerinde, diğer substrat derişimi sabit tutularak, başlangıç tepkime hızları belirlenip Lineweaver-Burk grafiğinin eğimi ve kesim noktasından tribütirin ve metanol-metil asetat için Michaelis-Menten sabitleri (K_m) sırasıyla 0.1 M ve 50 M olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.14' te metanol-metil asetat için çizilen Lineweaver-Burk grafiği gösterilmektedir.



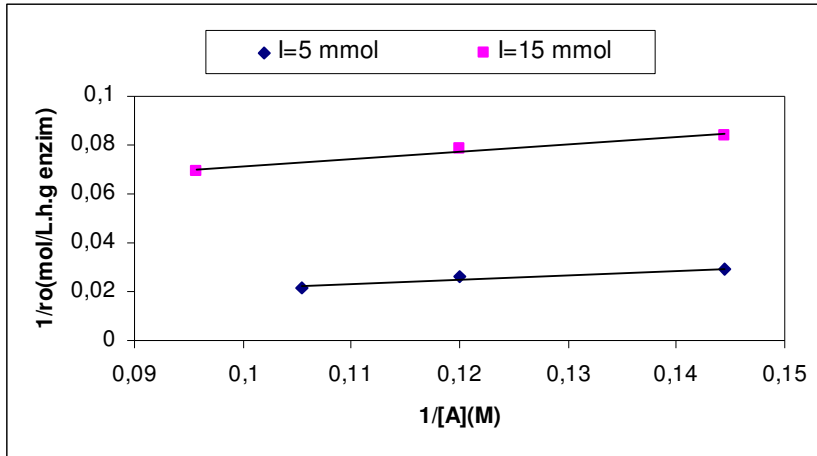
Şekil 4.14. Metanol-metil asetat için Lineweaver-Burk grafiği

Tepkime şartları : 5 mmol tribütirin, 15, 20, 25, 30 mmol metanol-metil asetat, % 5 enzim, 25 °C, 200 rpm karıştırma hızı (A: Metanol-metil asetat).

K_m değerlerine bakıldığında, tribütirinin küçük, metanol-metil asetatın ise büyük K_m değerine sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuçtan, enzimin tribütirine olan ilgisinin (afinitesinin) metanol-metil asetata olana göre daha fazla olduğu çıkarılmıştır. Daha önce belirtildiği gibi, yüksek tribütirin derişimleri, inhibisyona neden olmaktadır; çünkü enzim, düşük tribütirin derişimlerinde doyunluğa ulaşmaktadır. Aynı şekilde, yüksek metanol-metil asetat derişimleri, enzimi inhibe edecek bir etki yapmamaktadır; çünkü, büyük K_m değerinden dolayı, enzimin metanol-metil asetat karışımına olan hassasiyeti düşüktür diye düşünülebilir.

4.2.6. Tribütirin inhibisyonunun incelenmesi

Tribütirin inhibisyonunun varlığını ve türünü incelemek amacıyla sabit tribütirin derişimleri için, farklı metanol-metil asetat derişimlerinde tepkime hızları belirlenmiştir. 15 mmol tribütirin derişiminde, 5 mmol tribütirin derişimine göre daha düşük tepkime hızları elde edilmiştir. Bu sonuç, Lineweaver-Burk grafiğinden daha iyi görünmektedir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Tribütirin inhibisyonunun incelenmesi

Tepkime şartları : 5 mmol veya 15 mmol tribütirin, 15, 20, 25, 30 mmol metanol-metil asetat, % 5 enzim, 25 °C, 200 rpm karıştırma hızı (A: Metanol-metil asetat)

Grafiğe göre, tribütirin derişimi arttıkça tepkime hızı düşmüştür. Bu, tribütirin inhibisyonu varlığının bir göstergesidir. Doğruların birbirine paralel olması ise yarı yarışmalı substrat inhibisyonu olduğunu gösterir.

4.2.7. Tribütirin inhibisyon sabitinin belirlenmesi

Michaelis & Menten kinetiği, yarı yarışmalı substrat inhibisyonu halinde "Eşitlik 4.1." deki gibi ifade edilmektedir (bkz. Genel Bilgiler-Substrat inhibisyonu).

$$r = \frac{r_m [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_{SI}}} \quad (4.1)$$

burada, r_m , en yüksek tepkime hızı, K_m , tribütirin için Michaelis sabiti, K_{SI} , tribütirin inhibisyon sabitidir.

Farklı tribütirin derişimlerinde başlangıç hızları belirlendikten sonra tribütirin inhibisyon sabiti, K_{SI} , Systat 12 bilgisayar programıyla, deneysel verilerin “Eşitlik 4.1” deki denkliğe uydurularak tespit edilmiştir. Bu şekilde K_{SI} , 22.42 M olarak bulunmuştur.

4.2.8. Kinetik model

Transesterleşme tepkimeleri, iki substratla yürütüldüğü için enzimle substratlar arasındaki tepkime mekanizmasını açıklamak amacıyla ping-pong bi-bi mekanizması kullanılmaktadır. Bu mekanizmaya göre, tepkimeler seri halinde gerçekleşir. Bir ürün ortaya çıkar, daha sonra diğer substrat enzime bağlanır. Substratların biri ya da ikisi inhibisyon yapabilir.

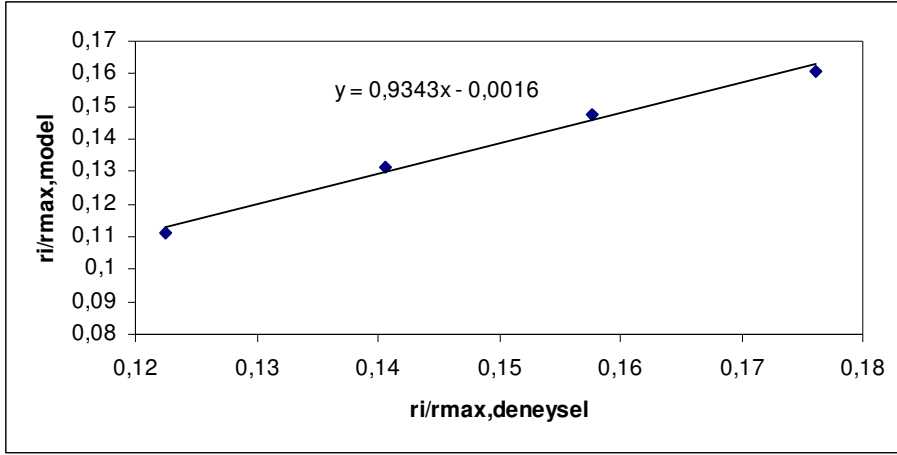
A' nın inhibisyonu varlığında tepkime hızı;

$$\frac{r_0}{r_{max}} = \frac{[A_0][B_0]}{K_{mB} [A_0] \left(1 + \frac{[A_0]}{K_{IA}} \right) + K_{mA} [B_0] + [A_0][B_0]} \quad (4.2)$$

şeklinde ifade edilir.

burada r_0 , başlangıç tepkime hızı, r_{max} , en yüksek tepkime hızı, $[A_0]$, başlangıç yağ derişimi, $[B_0]$, başlangıç alkol derişimi, K_{mA} , yağ için Michaelis sabiti, K_{mB} , alkol için Michaelis sabiti, K_{IA} , A (yağ) için inhibisyon sabitidir.

Başlangıç transesterleşme hızlarına bakıldığında metanol-metil asetat derişimi arttıkça arttığı, tribütirin derişimi arttıkça azaldığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda tribütirinin inhibisyon yaptığı tespit edilmiştir. Farklı tribütirin ve metanol-metil asetat derişimleri için elde edilen deneysel sonuçlarla “Eşitlik 4.2.” deki kinetik model ile hesaplanan hız değerleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.16). Deneysel veriler substrat inhibisyonlu ping-pong bi-bi mekanizması sonucunda çıkarılan kinetik modelle uyum göstermektedir. Grafiğin eğiminin 1' e yaklaşık olması kinetik model sonucu elde edilen verilerin deney verileriyle uyum sağladığını göstermektedir.



Şekil 4.16. Kinetik model ve deneysel sonuçların karşılaştırılması

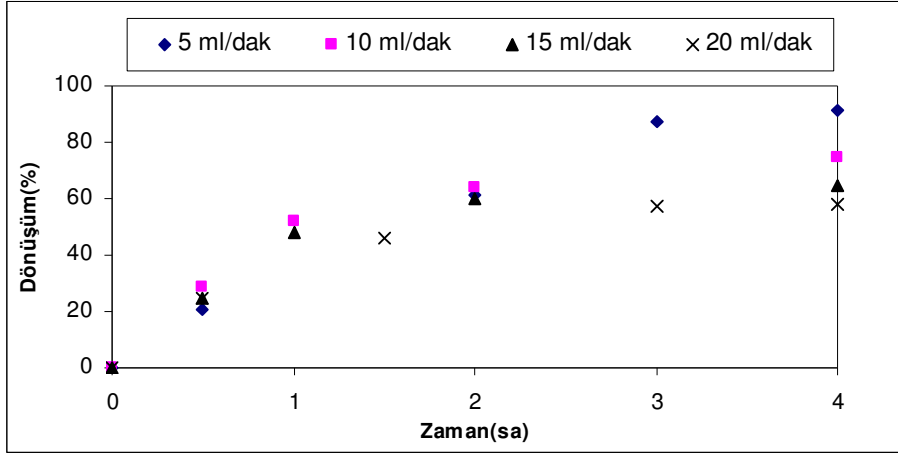
4.2.9. Akışkan yatak deneyleri

Tribütirin transesterleşme/interesterleşme tepkimesinin sürekli sistemde uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla yarı-sürekli akışkan yatak sisteminde sabit substrat ve enzim derişiminde farklı akış hızlarında zamanla substrat dönüşümü izlenmiştir.

Kesikli sistem deneylerinden sonra % 100 fazla miktarda metanol-metil asetat (6:1 metanol-metil asetat/yağ mol oranı) kullanımının inhibisyona neden olmadığı tespit edilmiş ve bu oranda farklı akış hızlarında yarı-sürekli döngülü bir sistemde akışkan yatak deneyleri yürütülmüştür. Literatürde transesterleşme tepkimeleri için reaktör olarak sabit veya dolgulu yatak önerilmiştir (Dossat et al, 1999). Bu gibi sistemlerde, gliserinin enzim etrafında birikmesinden doğan aktivite kaybı daha çok görülmektedir. Önerilen akışkan yatak sisteminde enzim partikülleri reaktör içerisinde sürekli hareket halinde olduğu için oluşan gliserin enzim yüzeyinde birikmeden tepkime çözeltisinde bulunan fazla metanol yardımıyla çözünmektedir. Akışkan yatağın bir diğer yararı ise az miktarda enzim kullanımınıdır. Bu çalışmada akışkan yatakta düşük enzim yüzdesiyle (% 1) % 90' lara varan dönüşüm elde edilmiştir.

Akış hızları 5, 10, 15 ve 20 mL/dak. olarak değiştirilmiş ve dönüşüm incelenmiştir (Şekil 4.17). En yüksek dönüşüm (% 91) 5 mL/dak. akış hızında 4 saat sonunda elde edilmiştir. Akış hızı arttıkça dönüşüm azalmıştır. 20 mL/dak. için dönüşüm değeri % 58' dir. Bunun nedeni hızlı akış hızlarında alıkonma süresinin düşük

olmasından dolayı enzimle substrat arasında yeterli etkileşimin gerçekleşmemesidir .



Şekil 4.17. Akışkan yatak deneyleri

Tepkime şartları: 0,6 mol tribütirin, 0,36 mol metanol-metil asetat (1:6 tribütirin/metanol-metil asetat mol oranı), 35 mL tepkime hacmi, 320 mg enzim (% 1), 25 °C

4.2.10. Tepkime ürünlerinin kütle spektroskopisi ile doğrulanması

Transesterleşme ve interesterleşme tepkimeleri, reaktantların ve ürünlerin derişimleri HPLC' de analiz edilerek izlenmiştir. Ancak tepkimenin başlıca ürünü olan metil bütiratın doğrulanması için spektroskopi kullanılmıştır. Bu amaçla, tepkime başında, ortasında ve sonunda örnekler alınıp GC/MS' de analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramlara ve GC/MS yazılımında var olan spektrum kütüphane taramasına göre tepkime ürünü metil bütirat doğrulanmıştır. Tepkimenin başında, ortasında ve sonunda alınan örneklerin analizi sonucunda elde edilen kromatogramlar, Ek 4' te sunulmuştur. Tepkimenin başında alınan örneğe ait kromatogramda metil bütirat piki görünmemekle beraber yüksek miktarda tribütirin olduğunu gösteren tribütirin piki vardır (bkz. Ek 4.1). Tepkimenin sonunda alınan örneğe ait kromatogramda metil bütirat piki ortaya çıkmış, tribütirin piki nerdeyse kaybolmuştur (bkz. Ek 4.3). Bu, tribütirinin tamamen metil bütirata dönüştüğünü göstermektedir. Ek 5' teki kütüphane taraması sonuçlarına göre, tepkimenin başında alınan örnekte % 100 olasılıkla yüksek bir oranda tribütirin olduğu, tepkimenin ortasında alınan örnekte tribütirin oranının biraz düştüğü,

tepkimenin sonunda alınan örnekte ise tribütirinin tamamen tükendiği görülmektedir. Ayrıca, üçüncü örnekte % 100 olasılıkla yüksek oranda metil bütirat olduğu sonuçlardan anlaşılmaktadır.

5. SONUÇLAR

- Bu çalışmada yağlar için model bir substrat olan tribütirinin lipaz aracılığıyla hidroliz ve transesterleşme/interesterleşme tepkimeleri incelenmiştir.
- Tribütirinin suda çözünür halde ve emülsiyon halinde hidrolizi incelenmiş, hidroliz tepkimesi için optimum pH, sıcaklık, karıştırma hızı, enzim derişimi ile Michaelis-Menten sabitleri belirlenmiştir. Tutuklanmış lipazın tekrar kullanılabilirliği, yani, işletme kararlılığı test edilmiştir. Ayrıca, tepkime ortamına belirli oranlarda katılan bazı organik çözücülerin hidroliz hızı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.
- Novozym 435 ile tribütirinin hidroliz tepkimesi için optimum pH, 7.0, optimum sıcaklık, 50 °C, optimum karıştırma hızı, 300 rpm, optimum enzim derişimi, 100 mg tutuklanmış enzim/30 mL tepkime hacmi olarak belirlenmiştir.
- Enzim aktivitesi, tribütirinin hem çözünür halde hem de emülsiyon halinde olduğu durumda, Michaelis&Menten kinetiğine uygun davranış göstermiştir. Michaelis&Menten parametreleri, V_m , 0.425 $\mu\text{mol BA}/(\text{mg E.dak})$, K_m ise, 15.736 mM olarak saptanmıştır.
- Novozym 435' in işletme kararlılığını incelemek için tutuklanmış enzim tepkime sonrası süzülüp tekrar aynı tepkime şartlarında kullanılmıştır. Enzim aktivitesi 6 kullanım sonrasında yaklaşık % 60 oranında düşmüştür.
- Organik çözücülerin hidroliz hızı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla farklı hidrofobikliğe sahip organik çözücüler değişik oranlarda tepkime ortamına katılmış, organik çözücülerin hidroliz hızını düşürdüğü tespit edilmiştir. Ancak, hidrofobiklik ile hidroliz hızı arasında doğrudan bir bağlantı kurulamamıştır.
- Tribütirinin metanol ile transesterleşme ve metil asetat ile interesterleşme tepkimesi aynı anda gerçekleştirilmiş ve metanol ile beraber metil asetat kullanımının yararları araştırılmıştır. Karıştırma hızının etkisi, metanol ve metil asetatın hangi oranlarda tepkime ortamına katılacağı, tribütirin derişiminin etkisi, metanol-metil asetat karışımı derişiminin etkisi, Michaelis-Menten ve tribütirin için inhibisyon sabitleri, kesikli sistemde yapılan

deneşler sonucunda tespit edilmiştir. Tribütirinin metanol ve metil asetatla transesterleşme/interesterleşme tepkimesinin ping-pong bi-bi mekanizmasına göre davranış gösterdiği ve deney sonuçlarının bu mekanizma sonucu çıkarılan kinetik modelin sonuçlarıyla uyum sağladığı görülmüştür. Kesikli sistemde elde edilen veriler ışığında tepkimenin sürekli sistemde uygulanabilirliğinin araştırılması amacıyla yarı-sürekli akışkan yatakta farklı akış hızlarında dönüşüm incelenmiştir.

- Lipazla katalize edilen transesterleşme tepkimelerinde karşılaşılan problemler ve yapılan çalışmalar dikkate alınarak, metanol inhibisyonunun ve gliserinden dolayı aktivite kaybının olmadığı, az miktarda enzimle kısa sürede yüksek metil ester veriminin elde edildiği, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin en aza indirildiği ve sanayiye uygulanabilir bir tepkime sistemi önerilmiştir.
- Metanol ve metil asetatın ayrı ayrı tribütirinle verdikleri transesterleşme (metanol ile) ve interesterleşme (metil asetat ile) tepkimelerinin hızları karşılaştırılmış, transesterleşme/interesterleşme tepkimelerinde 5 mol metanol/1 mol metil asetat oranında metanol-metil asetat karışımı kullanılmasına karar verilmiştir.
- Metanol-metil asetat derişimi arttıkça başlangıç tepkime hızı artmıştır. Herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir. % 100 fazla miktarda (1:6 mol oranında) metanol-metil asetat karışımı kullanımının enzim aktivitesinde negatif bir etki yapmadığı görülmüştür.
- Tribütirin derişimi arttıkça başlangıç tepkime hızı azalmıştır. Dolayısıyla tribütirin yüksek derişimlerde inhibisyona neden olmaktadır. Tribütirin derişimi, sitokiyometrik oranın (1:3 mol oranı) üzerinde kullanıldığı durumda, enzim aktivitesini düşürmektedir.
- Tribütirin ve metanol-metil asetat için Michaelis-Menten sabitleri (K_m) sırasıyla 0.1 M ve 50 M olarak hesaplanmıştır.
- Tribütirinin yarı yarışmalı substrat inhibisyonu yaptığı belirlenmiş, tribütirin inhibisyon sabiti, K_{SI} , 22.42 M olarak bulunmuştur.

- Deneysel veriler substrat inhibisyonlu ping-pong bi-bi mekanizması sonucunda çıkarılan kinetik modelle uyum göstermektedir.
- Yarı-sürekli sistemde akışkan yatakta düşük enzim yüzdesiyle (% 1) % 90' lara varan dönüşümler gözlenmiştir. En yüksek dönüşüm (% 91) 5 mL/dak. akış hızında 4 saat sonunda elde edilmiştir. Akış hızı arttıkça dönüşüm azalmıştır.
- Tepkime ürününün metil bütirat olduğu GC/MS' de analiz yapılarak doğrulanmış, transesterleşme/interesterleşme tepkimesinin verimli bir şekilde gerçekleştiği kanıtlanmıştır.

Bu çalışmanın devamı niteliğinde olacak çalışmalar, lipazla yağların hidrolizini artıracak yeni çözücü sistemlerinin araştırılması ve optimize edilmesi, hidroliz tepkimesinin sürekli sistemde yürütülebilmesi için farklı reaktörlerin geliştirilmesi, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin kolaylaştırılması ve maliyetinin düşürülmesi için proses önerilmesi gibi konular olabilir.

Yağlardan metanol ve metil asetat ile transesterleşme ve interesterleşme tepkimesi aracılığıyla metil ester üretimi kısmında ise, yarı-sürekli sistemde akışkan yatakta kullanılabilirliği kanıtlanmış tepkime sisteminin kesikli düzende elde edilmiş veriler ışığında sürekli sisteme uyarlanması ve metil ester veriminin izlenmesi, sürekli sistemde enzim deaktivasyonunun ne derecede olduğunun gözlenmesi gelecekte yapılabilecek çalışmalar arasındadır. Bu bağlamda, farklı partikül boyutlarındaki tutuklanmış enzimlerin farklı oranlarda tepkime ortamına katılarak akışkanlığı ve verimi nasıl etkilediği incelenebilir. Ayrıca, sürekli düzende akışkan yatak sistemiyle dolgu yatak sisteminin karşılaştırılması yapılabilir.

Bunların yanında, tribütirinin metanol ile transesterleşme ve metil asetat ile interesterleşme tepkimeleri, tepkimelerle eş zamanlı olarak, kütle spektroskopisi ile izlenerek tepkimenin mekanizması daha iyi anlaşılabilir. Bu şekilde, inhibisyonlu ping-pong bi-bi mekanizmasına ek olarak veya onu destekleyen bir kinetik model ortaya çıkarılabilir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

Bailey, J. E., Ollis, D. F., 1986, Applied enzyme catalysis. In: Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd Ed., New York, NY, McGraw-Hill, pp. 157-227.

Balcao, V.M., Paiva, A.L., Malcata, F.X., 1996, Bioreactors with immobilized lipases: state of art, Enzyme and Microbial Technol., 18, 392-416.

Barnwal, B. K., Sharma, M. P., 2005, Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 9, 363-378.

Castillo, E., Dossat, V., Marty, A., Condoret, J.S., Combes, D., 1997, The role of silica gel in lipase-catalyzed esterification reactions of high polar substrates, J Am Oil Chem Soc, 74, 77-85.

Çelebi, S. S., 1980, Trigliceridlerin serbest ve tutuklanmış *Candida* lipazı ile hidrolizinin kinetiği, Doktora Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi.

Demirbaş, A., 2005, Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods, Progress in Energy and Combustion Science, 31, 466-487.

Dossat, V., Combes, D., Marty, A., 1999, Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production, Enzyme and Microbial Technology, 25, 194-200.

Du, W., Xu, Y., Dehua, L., Zeng, J., 2004, Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 30, 125-129.

Fukuda, H., Kondo, A., Noda, H., 2001, Biodiesel fuel production by transesterification of oils, Journal of Bioscience and Engineering, 92, 405-416.

Gandhi, N. N., Patil, N. S., Sawant, S. B., Joshi, J. B., 2000, Lipase-catalyzed esterification, Catal. Rev.–Sci. Eng., 42(4), 439-480.

Gupta, R., Rathi, P., Bradoo, S., 2003, Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils, Crit Rev Food Sci Nutr., 43, 635-44.

Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., 2006, Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235-251.

Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D., 2004, Lipases and their industrial applications: an overview, *Appl Biochem Biotechnol.*, 118(1-3),155-70.

Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., Hatada, Y., 1998, Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics and structures, *Extremophiles*, 2,185-90.

Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., Fukuda, H., 2001, Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 12-15.

Kirchner, G., Scollar, M. P., Klibanov, A. M., 1985, Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 107, 7072-251.

Köse, Ö., Tüter, M., Aksoy, H.A., 2002, Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium, *Bioresource Technology*, 83, 125-129.

Lide, R. David, 2003, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 84th Edition, CRC Pres, pp. 16/43-47.

Linko, Y. Y., Lamsa, M., Wu, X., Uosukainen, E., Seppala, J., Linko, P., 1998, Biodegradable products by lipase biocatalysis, *J. Biotechnol*, 66(1), 41-50.

Lott, J. A., Lu, C. J., 1991, Lipase isoforms and amylase isoenzymes-assays and application in the diagnosis of acute pancreatitis, *Clin Chem.*, 37, 361-8.

Macedo, G. A., Lozano, M. M. S., Pastore, G. M., 2003, Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp., *J Biotechnol.*, 6.

Nie, K., Xie, F., Wang, F., Tan, T., 2006, Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43, 142-147.

Noor, I. M., Hasan, M., Ramachandran, K. B., 2003, Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase, *Process Biochemistry*, 39, 13-20.

Pinto, A. C., Guarieiro, L. L. N., Rezende, M. J. C., Ribeiro, N. M., Torres, E. A., Lopes, W. A., Pereira, P. A. P., Andrade, J. B., 2005, Biodiesel: an overview, *J. Braz. Chem. Soc.*, vol 16.

Rizzi, M., Stylos, P., Riek, A., 1992, A kinetic-study of immobilized lipase catalyzing the synthesis of isoamyl acetate by transesterification in normal-hexane, *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 367-382.

Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., Tominaga, Y., 1999, Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 789-793.

Shuler, M. L., Kargi, F., 2002, *Bioprocess engineering: Basic concepts*, Prentice-Hall International Editions, Second edition, pp. 57-67.

Soumanou, M. M., Bornscheuer, U. T., 2003, Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil, *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 97-103.

Srivastava, A., Prasad, R., 2000, Triglycerides-based diesel fuels, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4, 111-133.

Stevenson, D.E., Stanley, R.A., Furneaux, R.H., 1994, Near-quantitative production of fatty acid alkyl esters by lipase-catalyzed alcoholysis of fats and oils with adsorption of glycerol by silica gel, *Enzyme Microbial Technol.*, 16, 478-84.

Uçar, T., 1984, Triglyceridlerin *Candida Cylidracea* lipazı ile hidrolizinde yüzey ve çözücü etkileri-ara yüzey kinetiği, Doktora Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi.

Wu, H., Tsai, M., 2004, Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase, *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 488-493.

Yadav, G. D., Devi, K. M., 2004, Immobilized lipase-catalyzed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of

tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling, *Chemical Engineering Science*, 59, 373-383.

Yadav, G. D., Devi, K. M., 2004, Kinetics of hydrolysis of tetrahydrofurfuryl butyrate in a three phase containing immobilized lipase from *Candida antarctica*, *Biochemical Engineering Journal*, 17, 57-63.

Yadav, G. D., Lathi, P. S., 2005, Lipase catalyzed transesterification of methyl acetoacetate with *n*-butanol, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32, 107-113.

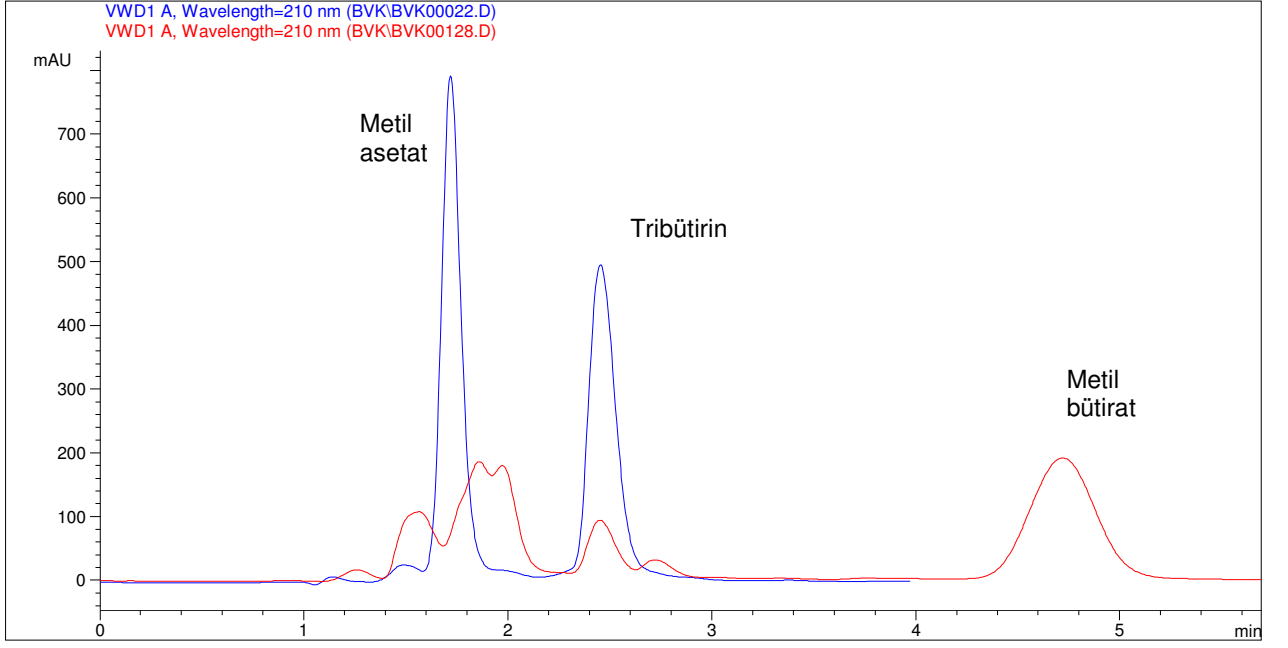
Yadav, G. D., Trivedi, A. H., 2003, Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of *n*-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 783-789.

EK 1

HPLC ŞARTLARI

HPLC	: Agilent 1100
Kolon (Sabit faz)	: Hichrom C18 ters faz kolon, 10 cm, 4.6 mm i.d.
Dedektör	: Değişken Dalga Boyu Detektörü (UV-Vis)
Hareketli faz	: Metanol : Su (90:10) (hacimce)
Akış hızı	: 0.8 mL/dak.
Detektör dalga boyu	: 210 nm
Kolon sıcaklığı	: 25 °C
Kolon basıncı	: 130 bar
Enjeksiyon hacmi	: 20 µL
Analiz süresi	: 10 dakika

EK 2. HPLC KROMATOGRAMLARI



Şekil Ek2.1. Metil asetat, tribütirin, metil bütirata ait HPLC kromatogramı

EK 3

GC/MS ŞARTLARI

GC/MS : Agilent 6890 GC System 5973 MSD

Kolon (Sabit faz) : HP-5MS, 0.25mm×30m×0.25µm

Taşıyıcı gaz : Helyum

Akış hızı : 1 mL/dak.

Fırın şartları

Başlangıç sıcaklığı : 40 °C

Başlangıç bekleme süresi : 5 dakika

5 °C/dak hızla 250 °C' ye kadar doğrusal artış

Bitiş bekleme süresi : 10 dakika

Split oranı : (50:1)

EK 4

GC/MS KROMATOGRAMLARI

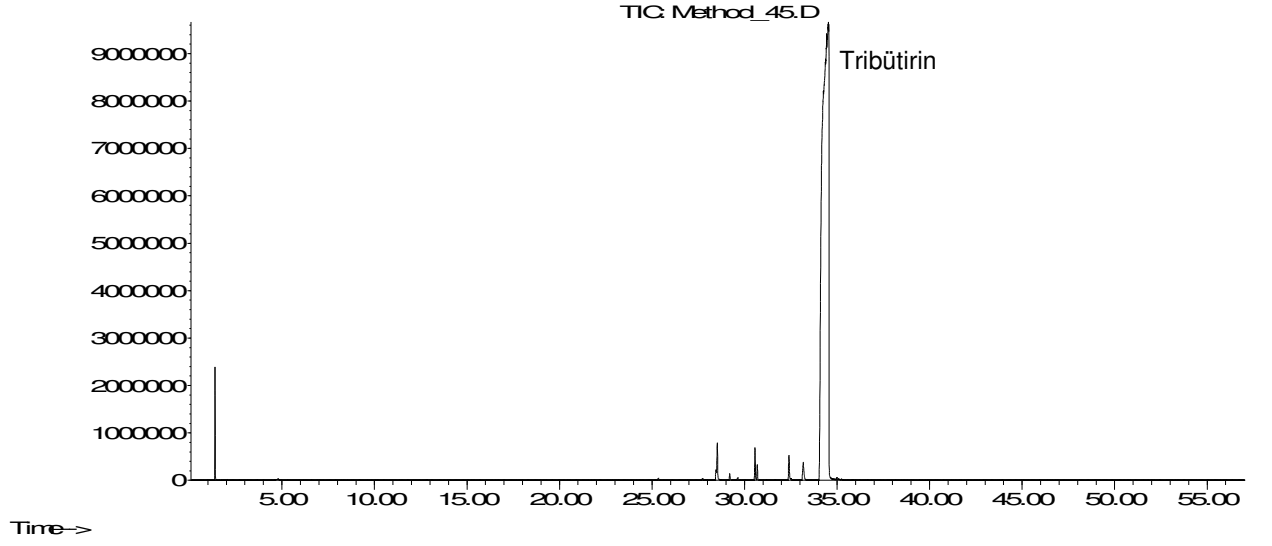
EK 4.1. Tepkimenin başında alınan örneğe ait kromatogram

EK 4.2. Tepkimenin ortasında alınan örneğe ait kromatogram

EK 4.3. Tepkimenin sonunda alınan örneğe ait kromatogram

EK 4.1

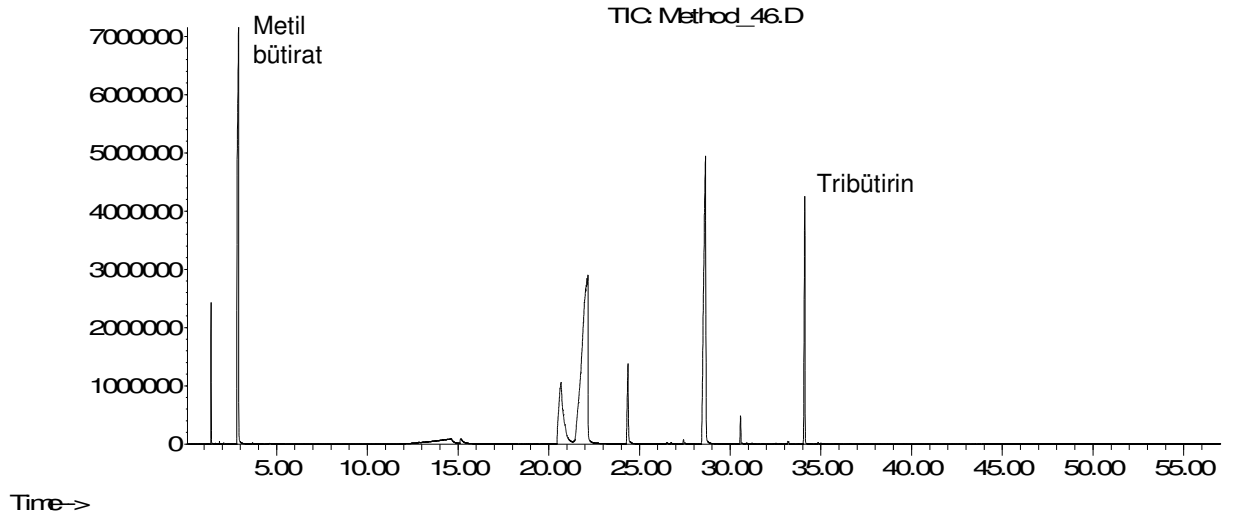
Abundance



Şekil Ek4.1. Transesterleşme tepkimesinin başında alınan örneğin kromatogramı

EK 4.2

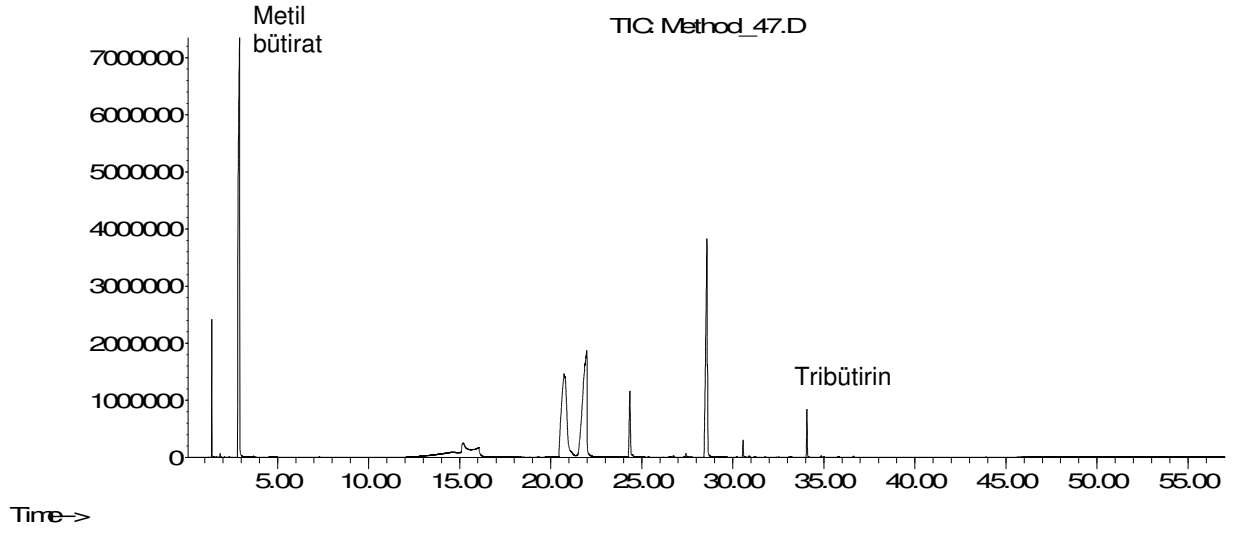
Abundance



Şekil Ek4.2. Transesterleşme tepkimesinin ortasında alınan örneğin kromatogramı

EK 4.3

Abundance



Şekil Ek4.3. Transesterleşme tepkimesinin sonunda alınan örneğin kromatogramı

EK 5.1

Area Percent Report

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\gas\
Data File : Method_41.D
Acq On : 15 Jun 2007 1:32
Operator :
Sample : 1
Misc :
ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: AUTOINT1.E
Integrator: ChemStation

Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FAMECARBOWAX.M
Title :

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.625	270	295	311	BB	30801	243787	0.07%	0.033%
2	2.076	375	381	391	BB	39676	465273	0.14%	0.064%
3	3.631	664	678	692	BB	23127	474505	0.14%	0.065%
4	5.018	832	943	1013	BB 2	42489	8767349	2.59%	1.199%
5	7.238	1357	1367	1389	BB	12138	336037	0.10%	0.046%
6	12.809	2420	2431	2443	BB 2	21753	505905	0.15%	0.069%
7	25.316	4806	4820	4852	BB 2	94092	2465973	0.73%	0.337%
8	27.704	5251	5276	5297	BB	82902	2167310	0.64%	0.297%
9	27.871	5300	5308	5315	BB	19822	446627	0.13%	0.061%
10	27.950	5315	5323	5338	BB	22889	515125	0.15%	0.070%
11	28.536	5399	5435	5474	BB	1358986	56810455	16.76%	7.772%
12	29.196	5532	5561	5582	BB	266957	6830948	2.02%	0.935%
13	29.610	5602	5640	5672	BB	107669	2744378	0.81%	0.375%
14	30.563	5803	5822	5835	BB	1161038	28537978	8.42%	3.904%
15	30.688	5835	5846	5866	BB	545606	12692710	3.75%	1.737%
16	31.165	5925	5937	5946	BB 2	32692	720559	0.21%	0.099%
17	31.631	6009	6026	6037	BB	25236	598237	0.18%	0.082%
18	31.735	6037	6046	6066	BB 6	10289	337670	0.10%	0.046%
19	32.400	6128	6173	6185	BB 2	686567	16548384	4.88%	2.264%
20	33.170	6290	6320	6381	BB	532012	34181350	10.09%	4.676%
21	34.484	6460	6571	6576	BB 2	528173	338905416	100.00%	46.366%
22	34.667	6577	6606	6646	BB	4204441	208800085	61.61%	28.566%
23	35.055	6652	6680	6689	BB 2	70971	1834956	0.54%	0.251%
24	35.133	6689	6695	6702	BB	25167	462676	0.14%	0.063%
25	35.264	6702	6720	6743	BB	30241	584462	0.17%	0.080%
26	35.892	6824	6840	6853	BB 4	29375	1141058	0.34%	0.156%
27	36.651	6953	6985	6996	BB 3	38772	955540	0.28%	0.131%
28	43.898	8341	8369	8407	BB 2	49534	1857471	0.55%	0.254%

Library Search Report

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\gas\

Data File : Method_41.D
 Acq On : 15 Jun 2007 1:32
 Operator :
 Sample : 1
 Misc :
 ALS Vial : 12 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\HPCH1607.L Minimum Quality: 30
 C:\Database\Wiley7Nist05.L Minimum Quality: 50
 C:\Database\wiley7n.l

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - AUTOINT1.E

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual	
1	1.63	0.03	C:\Database\Wiley7Nist05.L Ethane, 1,1-dimethoxy- (CAS); Dime thylacetal; 1,1-Dimethoxyethane; E thylidene dimethyl ether; Acetalde hyde dimethyl acetal; Acetaldehyde , dimethyl acetal; Dimethyl acetal ; CH3CH(OCH3)2; 1,1'-Dimethoxyetia ne; Dimethyl aldehyde; Methyl form yl; UN 2377 Ethane, 1,1-dimethoxy- 339953 000534-15-6 74 Ethane, 1,1-dimethoxy-; Acetaldehy 339952 000534-15-6 74 de, dimethyl acetal; Dimethyl acet al; Ethylidene dimethyl ether; 1,1 -Dimethoxyethane; CH3CH(OCH3)2; 1, 1'-Dimethoxyetiane; Dimethyl aldeh yde; UN 2377				
2	2.08	0.06	C:\Database\Wiley7Nist05.L Benzene (CAS); Phene; Benzol; Benz 337355 000071-43-2 91 ole; Pyrobenzol; [6]Annulene; Pyro benzole; Coal naphtha; Phenyl hydr ide; Cyclohexatriene; Benzolene; B icarburet of hydrogen; Carbon oil; Mineral naphtha; Motor benzol; Be nzen; Benzen; Benzin; Benzine; Be nzolo; Fenzen; Ni Benzene (CAS); Phene; Benzol; Benz 337360 000071-43-2 91 ole; Pyrobenzol; [6]Annulene; Pyro benzole; Coal naphtha; Phenyl hydr ide; Cyclohexatriene; Benzolene; B icarburet of hydrogen; Carbon oil; Mineral naphtha; Motor benzol; Be nzen; Benzen; Benzin; Benzine; Be nzolo; Fenzen; Ni Benzene 337351 000071-43-2 91				
3	3.63	0.06	C:\Database\HPCH1607.L 11.75 PHENYL ETHYL ALCOHOL (=2-PHE 1406 000060-12-8 39 NYLETHYL ALCOHOL; 19.73 SABINYL ACETATE<TRANS-> (TRA 1412 053833-85-5 38 NS for Ac vs. IPP) 10.66 TOLUALDEHYDE<PARA-> 1556 000104-87-0 9				
4	5.02	1.20	C:\Database\Wiley7Nist05.L				

Butanoic acid (CAS); n-Butyric aci 339216 000107-92-6 90
 d; Butyric acid; 1-Butyric acid; n
 -Butanoic acid; Ethylacetic acid;
 Propylformic acid; 1-Propanecarbox
 ylic acid; ETHYL ACETIC ACID; n-C3
 H7COOH; Propanecarboxylic acid; Bu
 tanic acid; Buttersaeure; IMET 339
 3; Kyselina masel
 Butanoic acid; Butyric acid; n-But 339219 000107-92-6 90
 anoic acid; n-Butyric acid; Ethyla
 cetic acid; Propylformic acid; 1-B
 utyric acid; 1-Propanecarboxylic a
 cid; n-C3H7COOH; Propanecarboxylic
 acid; Butanic acid; Buttersaeure;
 IMET 3393; Kyselina maselna; UN 2
 820
 Butanoic acid (CAS); n-Butyric aci 339222 000107-92-6 90
 d; Butyric acid; 1-Butyric acid; n
 -Butanoic acid; Ethylacetic acid;
 Propylformic acid; 1-Propanecarbox
 ylic acid; ETHYL ACETIC ACID; n-C3
 H7COOH; Propanecarboxylic acid; Bu
 tanic acid; Buttersaeure; IMET 339
 3; Kyselina masel

- 5 7.24 0.05 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 4-Heptanone 347840 000123-19-3 78
 4-Heptanone 347844 000123-19-3 78
 4-Heptanone; Butyrone; Dipropyl ke 347842 000123-19-3 64
 tone; GBL; Propyl Ketone; (n-C3H7)
 2CO; Heptan-4-one; Di-n-propyl ket
 one; UN 2710
- 6 12.81 0.07 C:\Database\HPCH1607.L
 8.69 LIMONENE 171 000138-86-3 97
 5.53 TRICYCLENENE 942 000508-32-7 38
 16.93 DIHYDRO CARVEOL<NEOISO-> 624 018675-34-8 38
- 7 25.32 0.34 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Oxirane, 2,2'-[1,4-butanediylbis(o 400123 002425-79-8 50
 xymethylene)]bis-
 2,2,3-Triethyloxirane 7482 053229-40-6 45
 3,4-Epoxyhexanoic acid, ethyl este 23622 061454-92-0 43
 r; Ethyl (3-ethyl-2-oxiranyl)aceta
 te #
- 8 27.70 0.30 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Propanoic acid, 2-methyl-, octyl e 399431 000109-15-9 59
 ster
 Methyl 1-Ethenylbutyl Ether 348092 000000-00-0 9
 Cyclooctane, methoxy-; Ether, cycl 363620 013213-32-6 9
 ooctyl methyl; Methoxycyclooctane;
 Cyclooctyl methyl ether #
- 9 27.87 0.06 C:\Database\wiley7n.l
 4-Carboethoxy-3-hydroxy-2-(5H)-fur 75462 021053-75-8 5
 anone \$\$ 3-Furancarboxylic acid, 2
 ,5-dihydro-4-hydroxy-5-oxo-, ethyl
 ester (CAS) \$\$ 3-Furoic acid, 2,5
 -dihydro-4-hydroxy-5-oxo-, ethyl e

ster
2,6-Dimethyl-4-isothiocyanato-1,3- 77224 000000-00-0 5
dioxane
Acrolein oxime 1452 000000-00-0 4

- 10 27.95 0.07 C:\Database\wiley7n.l
Butanoic acid, ethenyl ester \$\$ Bu 14806 000123-20-6 9
tyric acid, vinyl ester \$\$ Vinyl b
utyrate \$\$ n-Butyric acid vinyl es
ter \$\$ UN 2838 \$\$ Vinyl butyrate,
inhibited \$\$ Vinylester kyseliny m
aselne
Morpholine, 3-methyl-2-phenyl- (CA 82231 000134-49-6 9
S) \$\$ Phenmetrazine \$\$ A 66 \$\$ Pro
bese-P \$\$ Oxazimedrine \$\$ Phenmetr
azin \$\$ Psychamine A 66 \$\$ 3-Methy
l-2-phenylmorpholine \$\$ 2-Phenyl-3
-methylmorpholine \$\$ PRELUDIN
Tricyclo[4.4.1.1(3,8)]dodeca-4,9-d 60489 039840-95-4 9
iene \$\$ TRICYCLO[4.4.1.13,8]DODECA
-4,9-DIENE
- 11 28.54 7.77 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 376706 000557-25-5 50
ester; .alpha.-Monobutyryn; Butyr
in, 1-mono-; Glycerol-.alpha.-mono
-n-butyrate; 1-Monobutyryn; Mono-n
-butyrin; 2,3-Dihydroxypropyl buty
rate #
Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 376707 000557-25-5 43
ester
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436105 000060-01-5 38
ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
ol tributyrate; Butyrin; Tributin;
Tributyryn; Tributyroin; Butyrin,
tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
yl triglyceride; Tributyril glycer
ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
l tributanoate; B
- 12 29.20 0.93 C:\Database\Wiley7Nist05.L
2-DEUTERIOGLYCERYL TRIBUTANOATE 191554 054934-80-4 56
Nonanoic acid, 9-(nonyloxy)-, meth 206067 039692-47-2 10
yl ester; Methyl 9-nonyloxynonanoa
te
2-Furanmethanol, tetrahydro- (CAS) 343320 000097-99-4 9
; Tetrahydrofurfuryl alcohol; ALFA
-TETRAHYDROFURFURYL ALCOHOL; Qo th
fa; THFA; Tetrahydro-2-furylmethan
ol; Tetrahydro-2-furanmethanol; Te
trahydro-2-furancarbinol; Tetrahyd
ro-2-furanylmethanol; Tetrahydro-2
-furfuryl alcohol
- 13 29.61 0.38 C:\Database\Wiley7Nist05.L
2-DEUTERIOGLYCERYL TRIBUTANOATE 191554 054934-80-4 56
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436105 000060-01-5 17
ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
ol tributyrate; Butyrin; Tributin;
Tributyryn; Tributyroin; Butyrin,

- tri-; Glycerin tributyrate; Butyryl triglyceride; Tributyril glyceride; Glyceryl tributyrate; Glycerol tributanoate; B
 Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycerol tributyrate; Butyryn; Tributin; Tributyrin; Tributyroin; Butyryn, tri-; Glycerin tributyrate; Butyryl triglyceride; Tributyril glyceride; Glyceryl tributyrate; Glycerol tributanoate; B
- 14 30.56 3.90 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Tributyrin; Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester; Butyryn, tri-; Butyryl triglyceride; Glycerin tributyrate; Glycerol tributanoate; Glycerol tributyrate; Glyceryl tributyrate; Tri-n-butyryn; Tributin; Tributyroin; Tributyril glyceride; Butyric acid tri
 Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycerol tributyrate; Butyryn; Tributin; Tributyrin; Tributyroin; Butyryn, tri-; Glycerin tributyrate; Butyryl triglyceride; Tributyril glyceride; Glyceryl tributyrate; Glycerol tributanoate; B
 2-DEUTERIOGLYCERYL TRIBUTANOATE 191554 054934-80-4 39
- 15 30.69 1.74 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycerol tributyrate; Butyryn; Tributin; Tributyrin; Tributyroin; Butyryn, tri-; Glycerin tributyrate; Butyryl triglyceride; Tributyril glyceride; Glyceryl tributyrate; Glycerol tributanoate; B
 Tributyrin; Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester; Butyryn, tri-; Butyryl triglyceride; Glycerin tributyrate; Glycerol tributanoate; Glycerol tributyrate; Glyceryl tributyrate; Tri-n-butyryn; Tributin; Tributyroin; Tributyril glyceride; Butyric acid tri
 Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycerol tributyrate; Butyryn; Tributin; Tributyrin; Tributyroin; Butyryn, tri-; Glycerin tributyrate; Butyryl triglyceride; Tributyril glyceride; Glyceryl tributyrate; Glycerol tributanoate; B
- 16 31.16 0.10 C:\Database\HPCH1607.L
 31.51 ISOEUGENOL ACETATE<Z-> 889 097412-23-2 47

22.70 EUGENOL 1132 000097-53-0 43
33.46 ISOEUGENOL ACETATE<E-> 890 005912-87-8 38

- 17 31.63 0.08 C:\Database\wiley7n.l
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 251655 000060-01-5 9
ester (CAS) \$\$ Tri-n-butyryn \$\$ Gl
ycerol tributyrate \$\$ Butyryn \$\$ T
ributin \$\$ Tributyrin \$\$ Tributyro
in \$\$ Butyryn, tri- \$\$ Glycerin tr
ibutyrate \$\$ Butyryl triglyceride
\$\$ Tributyril glyceride \$\$ Glycery
l tributyrate \$\$
Cyclooctane, methoxy- \$\$ Ether, cy 38703 013213-32-6 5
clooctyl methyl \$\$ Methoxycyclooct
ane
PROPIOLACTAM 1454 000930-21-2 4
- 18 31.74 0.05 C:\Database\Wiley7Nist05.L
2-Guanidino-4(3H)-quinazolinone 66977 062936-92-9 53
5,5-Dimethyl-3-oxo-2-phenyl-1-pyrr 400610 000000-00-0 50
oline, 1-oxide
3-[4'-(t-Butyl)-2',6'-dimethylphen 86232 000000-00-0 38
yl]propanal
- 19 32.40 2.26 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Tributyryn; Butanoic acid, 1,2,3-p 436106 000060-01-5 64
ropanetriyl ester; Butyryn, tri-;
Butyryl triglyceride; Glycerin tri
butyrate; Glycerol tributanoate; G
lycerol tributyrate; Glyceryl trib
utyrate; Tri-n-butyryn; Tributin;
Tributyroin; Tributyril glyceride;
Butyric acid tri
Tributyryn 436102 000060-01-5 56
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436104 000060-01-5 50
ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
ol tributyrate; Butyryn; Tributin;
Tributyryn; Tributyroin; Butyryn,
tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
yl triglyceride; Tributyril glycer
ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
l tributanoate; B
- 20 33.17 4.68 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Tributyryn; Butanoic acid, 1,2,3-p 436106 000060-01-5 90
ropanetriyl ester; Butyryn, tri-;
Butyryl triglyceride; Glycerin tri
butyrate; Glycerol tributanoate; G
lycerol tributyrate; Glyceryl trib
utyrate; Tri-n-butyryn; Tributin;
Tributyroin; Tributyril glyceride;
Butyric acid tri
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436104 000060-01-5 83
ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
ol tributyrate; Butyryn; Tributin;
Tributyryn; Tributyroin; Butyryn,
tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
yl triglyceride; Tributyril glycer
ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
l tributanoate; B

Tributyryn 436102 000060-01-5 64

- 21 34.48 46.37 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Tributyryn 436102 000060-01-5 90
Tributyryn; Butanoic acid, 1,2,3-p 436106 000060-01-5 83
ropanetriyl ester; Butyryn, tri-;
Butyryl triglyceride; Glycerin tri
butyrate; Glycerol tributanoate; G
lycerol tributyrate; Glyceryl trib
utyrate; Tri-n-butyryn; Tributin;
Tributyroin; Tributuryl glyceride;
Butyric acid tri
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436104 000060-01-5 83
ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
ol tributyrate; Butyryn; Tributin;
Tributyryn; Tributuroin; Butyryn,
tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
yl triglyceride; Tributuryl glycer
ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
l tributanoate; B
- 22 34.67 28.57 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Tributyryn; Butanoic acid, 1,2,3-p 436106 000060-01-5 83
ropanetriyl ester; Butyryn, tri-;
Butyryl triglyceride; Glycerin tri
butyrate; Glycerol tributanoate; G
lycerol tributyrate; Glyceryl trib
utyrate; Tri-n-butyryn; Tributin;
Tributyroin; Tributuryl glyceride;
Butyric acid tri
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436105 000060-01-5 83
ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
ol tributyrate; Butyryn; Tributin;
Tributyryn; Tributuroin; Butyryn,
tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
yl triglyceride; Tributuryl glycer
ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
l tributanoate; B
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436104 000060-01-5 83
ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
ol tributyrate; Butyryn; Tributin;
Tributyryn; Tributuroin; Butyryn,
tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
yl triglyceride; Tributuryl glycer
ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
l tributanoate; B
- 23 35.05 0.25 C:\Database\wiley7n.l
Tributyryn 251651 000060-01-5 47
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 251655 000060-01-5 40
ester (CAS) \$\$ Tri-n-butyryn \$\$ Gl
lycerol tributyrate \$\$ Butyryn \$\$ T
ributin \$\$ Tributuryl glyceride \$\$ Tributuroin
in \$\$ Butyryn, tri- \$\$ Glycerin tr
ibutyrate \$\$ Butyryl triglyceride
\$\$ Tributuryl glyceride \$\$ Glycery
l tributyrate \$\$
Tributyryn \$\$ Butanoic acid, 1,2,3 251653 000060-01-5 38
-propanetriyl ester \$\$ Butyryn, tr
i- \$\$ Butyryn \$\$ Butyryl triglycer

ide \$\$ Glycerin tributyrate \$\$ Gly
cerol tributanoate \$\$ Glycerol tri
butyrate \$\$ Glyceryl tributyrate \$
\$ Tri-n-butyryn \$\$ Tributrin \$\$ Tri
butyroin \$\$ Tribu

- 24 35.13 0.06 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Hexanoic acid, 2-tetrahydrofurylme 64032 002217-34-7 50
thyl ester; Tetrahydro-2-furanylme
thyl hexanoate #
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436105 000060-01-5 42
ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
ol tributyrate; Butyryn; Tributrin;
Tributyryn; Tributyroin; Butyryn,
tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
yl triglyceride; Tributryl glycer
ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
l tributanoate; B
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436104 000060-01-5 42
ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
ol tributyrate; Butyryn; Tributrin;
Tributyryn; Tributyroin; Butyryn,
tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
yl triglyceride; Tributryl glycer
ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
l tributanoate; B
- 25 35.26 0.08 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Tributyryn; Butanoic acid, 1,2,3-p 436106 000060-01-5 72
ropanetriyl ester; Butyryn, tri-;
Butryl triglyceride; Glycerin tri
butyrate; Glycerol tributanoate; G
lycerol tributyrate; Glyceryl trib
utyrate; Tri-n-butyryn; Tributrin;
Tributyroin; Tributryl glyceride;
Butyric acid tri
Tributyryn 436102 000060-01-5 72
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436101 000060-01-5 72
ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
ol tributyrate; Butyryn; Tributrin;
Tributyryn; Tributyroin; Butyryn,
tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
yl triglyceride; Tributryl glycer
ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
l tributanoate; B
- 26 35.89 0.16 C:\Database\wiley7n.l
Cyclooctane, methoxy- \$\$ Ether, cy 38703 013213-32-6 47
clooctyl methyl \$\$ Methoxycyclooct
ane
trans-2,3-Epoxydecane 56056 054125-39-2 47
3-Methyl-hepta-1,6-dien-3-ol 23018 000000-00-0 43
- 27 36.65 0.13 C:\Database\wiley7n.l
HOTRIENYL ACETATE 106437 000000-00-0 33
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-m 52822 000562-74-3 25
ethylethyl)- (CAS) \$\$ 4-Terpeneol
\$\$ Terpinene-4-ol \$\$ 1-Terpinen-4-
ol \$\$ 4-Carvomenthenol \$\$ p-Menth-
1-en-4-ol \$\$ TERPINEOL-4 \$\$ Terpin

en-4-ol \$\$ 1-Methyl-4-isopropyl-1-
cyclohexen-4-ol \$\$ 4-Terpinenol \$\$
Terpene-4-ol \$\$
Linalool \$\$ 1,6-Octadien-3-ol, 3,7 52700 000078-70-6 17
-dimethyl- (CAS) \$\$ Linalol \$\$.be
ta.-Linalool \$\$ Linalyl alcohol \$\$
2,6-Dimethyl-2,7-octadien-6-ol \$\$
allo-Ocimenol \$\$ p-Linalool \$\$ LI
NOLOOL (D) \$\$ 2,6-Dimethyl-2,7-oct
adiene-6-ol \$\$ 2,6-Dimethylocta-2,
7-dien-6-ol \$\$ 3,

28 43.90 0.25 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl 448510 000103-23-1 95
) ester
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl 448514 000103-23-1 91
) ester
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl 448512 000103-23-1 91
) ester

EK 5.2

Area Percent Report

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\gas\
Data File : Method_42.D
Acq On : 15 Jun 2007 2:42
Operator :
Sample : 2
Misc :
ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: AUTOINT1.E
Integrator: ChemStation

Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FAMECARBOWAX.M
Title :

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.207	200	215	227	BB	13951	183583	0.02%	0.007%
2	1.385	240	249	290	BB	3149953	36555075	4.00%	1.301%
3	1.626	290	295	305	BB	30528	348262	0.04%	0.012%
4	1.840	330	336	357	BB	89811	1182415	0.13%	0.042%
5	2.081	357	382	394	BB	39823	500579	0.05%	0.018%
6	2.332	418	430	441	BB	14281	225891	0.02%	0.008%
7	2.929	512	544	637	BB	8424237	598567757	65.50%	21.307%
8	3.641	665	680	701	BB	37826	742695	0.08%	0.026%
9	4.783	834	898	972	BB 2	24258	3396912	0.37%	0.121%
10	7.238	1311	1367	1389	BB	11701	325087	0.04%	0.012%
11	12.804	2233	2430	2440	BB 2	22538	617807	0.07%	0.022%
12	14.552	2440	2764	2769	BB	2870	-3484508	-0.38%	-0.124%
13	15.160	2769	2880	2927	BB 4	103733	8633225	0.94%	0.307%
14	20.772	3793	3952	4083	BB	1205563	338934365	37.09%	12.065%
15	22.458	4083	4274	4318	BB 2	2980199	913880685	100.00%	32.531%
16	24.411	4615	4647	4664	BB	1656247	90182558	9.87%	3.210%
17	26.489	5026	5044	5078	BB 2	34664	1979348	0.22%	0.070%
18	26.725	5079	5089	5122	BB	47282	1165646	0.13%	0.041%
19	27.306	5187	5200	5209	BB 2	10115	287606	0.03%	0.010%
20	27.427	5209	5223	5257	BB	131683	5284633	0.58%	0.188%
21	28.709	5401	5468	5521	BB	4918991	590569313	64.62%	21.022%
22	30.201	5741	5753	5791	BB 4	23028	712109	0.08%	0.025%
23	30.573	5808	5824	5843	BB	782717	19890222	2.18%	0.708%
24	30.892	5843	5885	5920	BB 8	34890	905183	0.10%	0.032%
25	31.175	5926	5939	5948	BB 2	27196	654172	0.07%	0.023%
26	31.746	6037	6048	6067	BB 6	10423	330660	0.04%	0.012%
27	32.390	6132	6171	6181	BB 2	20418	538730	0.06%	0.019%
28	32.489	6182	6190	6206	BB 3	29670	699786	0.08%	0.025%
29	33.170	6305	6320	6345	BB 2	86365	3788611	0.41%	0.135%
30	34.123	6440	6502	6532	BB	4819081	188534584	20.63%	6.711%
31	34.835	6605	6638	6655	BB 2	55218	1410186	0.15%	0.050%

32 34.976 6655 6665 6687 BB 2 27223 664879 0.07% 0.024%
 33 35.746 6797 6812 6818 BB 4 17830 377039 0.04% 0.013%
 34 36.604 6957 6976 6992 BB 3 26600 682949 0.07% 0.024%

Library Search Report

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\gas\
 Data File : Method_42.D
 Acq On : 15 Jun 2007 2:42
 Operator :
 Sample : 2
 Misc :
 ALS Vial : 13 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\HPCH1607.L Minimum Quality: 30
 C:\Database\Wiley7Nist05.L Minimum Quality: 50
 C:\Database\wiley7n.l

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - AUTOINT1.E

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	1.21	0.01	C:\Database\wiley7n.l Hydrazine, 1,1-dimethyl- ethylhydrazine ine N,N-Dimethylhydrazine 1,1-Dimethylhydrazine 2 methylhydrazine,unsymmetrical imethylhydrazine Urea (CAS) Ureophil \$ UR rbamide resin \$\$ Pseudourea \$\$ Varioform ii Urepearl 2)2CO methylethyl ether	742	000057-14-7	4
				806	000000-00-0	4
2	1.38	1.30	C:\Database\wiley7n.l Methanamine, N-methyl-N-nitroso- CAS) \$\$ DMNA \$\$ Dimethylamine, N-nitroso- -Nitroso-N,N-dimethylamine thyl-N-nitrosomethanamine 2NNO thylNitrosoamine Thiirane, methyl- nitroso dimethylamine	1913	000062-75-9	7
				2007	001072-43-1	7
				1916	000000-00-0	7
3	1.63	0.01	C:\Database\Wiley7Nist05.L Ethane, 1,1-dimethoxy- Ethane, 1,1-dimethoxy- Ethane, 1,1-dimethoxy-; de, dimethyl acetal; al; Ethylidene dimethyl ether;	339953	000534-15-6	83
				339956	000534-15-6	74
				339952	000534-15-6	39

-Dimethoxyethane; CH₃CH(OCH₃)₂; 1,
1'-Dimethoxyetiane; Dimethyl aldehy
de; UN 2377

- 4 1.84 0.04 C:\Database\HPCH1607.L
1.93 METHYL PROPANOATE 1147 000554-12-1 59
3.81 ISOPROPYL BUTANOATE (= ISOPRO 351 000638-11-9 2
PYL BUTYRATE)
3.17 HEXANEDINE<3,4-> (=BIPROPION 827 004437-51-8 1
YL)
- 5 2.08 0.02 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Benzene (CAS); Phene; Benzol; Benz 337354 000071-43-2 91
ole; Pyrobenzol; [6]Annulene; Pyro
benzole; Coal naphtha; Phenyl hydr
ide; Cyclohexatriene; Benzolene; B
icarburet of hydrogen; Carbon oil;
Mineral naphtha; Motor benzol; Be
nzenen; Benzen; Benzin; Benzine; Be
nzolo; Fenzen; Ni
Benzene 337351 000071-43-2 91
Benzene 337352 000071-43-2 91
- 6 2.33 0.01 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Propanoic acid, 2-methyl-, methyl 343184 000547-63-7 83
ester; Isobutyric acid, methyl est
er; Methyl isobutyrate; Methyl 2-m
ethylpropanoate; Methyl 2-methylpr
opionate; (CH₃)₂CHC(O)OCH₃; Methyl
isobutanoate; Methylester kyseliny
isomaselne; Methyl iso-butyrate
Propanoic acid, 2-methyl-, methyl 343191 000547-63-7 83
ester
Propanoic acid, 2-methyl-, methyl 343192 000547-63-7 83
ester (CAS); Methyl isobutyrate; M
ethyl isobutanoate; Methyl 2-methyl
propanoate; Methyl 2-methylpropio
nate; Isobutyric acid, methyl este
r; (CH₃)₂CHC(O)OCH₃; Methylester k
yseliny isomaselne; Methyl isobuty
rate; Methyl iso-
- 7 2.93 21.31 C:\Database\HPCH1607.L
2.43 METHYL BUTANOATE 76 000623-42-7 91
3.55 METHYL PENTANOATE (=METHYL V 1143 000624-24-8 37
ALERATE)
8.57 METHYL HEPTANOATE (= METHYL 1135 000106-73-0 9
ENANTHATE)
- 8 3.64 0.03 C:\Database\HPCH1607.L
11.75 PHENYL ETHYL ALCOHOL (=2-PHE 1406 000060-12-8 64
NYLETHYL ALCOHOL;
19.73 SABINYL ACETATE<TRANS-> (TRA 1412 053833-85-5 36
NS for Ac vs. IPP)
10.66 TOLUALDEHYDE<PARA-> 1556 000104-87-0 10
- 9 4.78 0.12 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Butanoic acid; Butyric acid; n-But 339219 000107-92-6 90
anoic acid; n-Butyric acid; Ethyla
cetic acid; Propylformic acid; 1-B

utyric acid; 1-Propanecarboxylic acid; n-C₃H₇COOH; Propanecarboxylic acid; Butanic acid; Buttersaeure; IMET 3393; Kyselina maselna; UN 2820
 Butanoic acid (CAS); n-Butyric aci 339211 000107-92-6 90
 d; Butyric acid; 1-Butyric acid; n-Butanoic acid; Ethylacetic acid; Propylformic acid; 1-Propanecarboxylic acid; ETHYL ACETIC ACID; n-C₃H₇COOH; Propanecarboxylic acid; Butanic acid; Buttersaeure; IMET 3393; Kyselina masel
 Butanoic acid (CAS); n-Butyric aci 339216 000107-92-6 90
 d; Butyric acid; 1-Butyric acid; n-Butanoic acid; Ethylacetic acid; Propylformic acid; 1-Propanecarboxylic acid; ETHYL ACETIC ACID; n-C₃H₇COOH; Propanecarboxylic acid; Butanic acid; Buttersaeure; IMET 3393; Kyselina masel

10 7.24 0.01 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 4-Heptanone 347840 000123-19-3 72
 3-Hexanone, 2-methyl- 347883 007379-12-6 56
 3-Hexanone, 2-methyl- (CAS); 2-Met 347880 007379-12-6 56
 hyl-3-hexanone; Isopropyl propyl ketone; Propyl isopropyl ketone; 2-Methylhexan-3-one; 3-HEXANON, 2-METHYL-

11 12.80 0.02 C:\Database\wiley7n.l
 Glycerin 5458 000056-81-5 25
 Glycerin 5461 000056-81-5 25
 1,2,3-Propanetriol (CAS) \$\$ Glycerol 5456 000056-81-5 25
 ol \$\$ Glyrol \$\$ Glycerin \$\$ Osmoglyn \$\$ Glysarin \$\$ Glycerine \$\$ Glyceritol \$\$ Glycyl alcohol \$\$ Trihydroxypropane \$\$ Propanetriol \$\$ Glycerin suppositories \$\$ 1,2,3-Trihydroxypropane \$\$ Propantriol \$\$ Synthetic glycerin

12 14.55 -0.12 C:\Database\wiley7n.l
 Glycerin 5458 000056-81-5 43
 1,2,3-Propanetriol (CAS) \$\$ Glycerol 5456 000056-81-5 9
 ol \$\$ Glyrol \$\$ Glycerin \$\$ Osmoglyn \$\$ Glysarin \$\$ Glycerine \$\$ Glyceritol \$\$ Glycyl alcohol \$\$ Trihydroxypropane \$\$ Propanetriol \$\$ Glycerin suppositories \$\$ 1,2,3-Trihydroxypropane \$\$ Propantriol \$\$ Synthetic glycerin
 Methane, nitro- (CAS) \$\$ Nitromethane 834 000075-52-5 5
 ane \$\$ Nitrocarbol \$\$ CH₃NO₂ \$\$ Nitrometan \$\$ UN 1261

13 15.16 0.31 C:\Database\wiley7n.l
 Glycerin 5458 000056-81-5 25
 Methane, nitro- (CAS) \$\$ Nitromethane 835 000075-52-5 9

ane \$\$ Nitrocarbol \$\$ CH3NO2 \$\$ Ni
trometan \$\$ UN 1261
Glycerin 5461 000056-81-5 9

- 14 20.77 12.06 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester 376707 000557-25-5 59
Butanoic acid, propyl ester (CAS); 355875 000105-66-8 28
Propyl butyrate; Propyl butanoate
; Propyl n-butyrate; n-Propyl butyrate; n-Propyl n-butyrate; Butyric acid, propyl ester; Propyl ester of butanoic acid; n-Butyric acid n-propyl ester; Propylester kyselin y maselne; BUTTER
methyl furfuryloxyacetate 14370 000000-00-0 23
- 15 22.46 32.53 C:\Database\Wiley7Nist05.L
2-Ethylhexyl ester of butanoic acid; 399427 025415-84-3 50
Butanoic acid, 2-ethylhexyl ester; 2-Ethylhexyl butyrate; 2-ethylhexyl butyrate; n-Butyric acid 2-ethylhexyl ester; 2-Ethylhexyl butyrate #; 2-Ethylhexyl butyrate (computer-generated name)
ISO AMYL BUTYRATE 23748 000106-27-4 39
Butanoic acid, 1-methylbutyl ester 374768 060415-61-4 39
; Butyric acid, sec-pentyl ester; sec-Amyl butyrate; UN 2620; Butanoic acid, 2-pentyl ester; 1-Methylbutyl butyrate #
- 16 24.41 3.21 C:\Database\wiley7n.l
Pentanoic acid, 2,2-dimethyl-, 2-hydroxyethyl ester \$\$ PENTANSAEURE, 2,2-DIMETHYL-, (2-HYDROXYETHYL)ESTER \$\$ BUTTERSAEURE, 2,2-DIMETHYL-, ETHYLESTER
Methyl 1-Ethenylbutyl Ether 15566 000000-00-0 9
Pentane, 1,1'-oxybis- \$ Pentyl ether 58298 000693-65-2 9
her \$\$ n-Amyl ether \$\$ n-Pentyl ether \$\$ Amyl ether \$\$ Di-n-amyl ether \$\$ Diamyl ether \$\$ Dipentyl ether \$\$ (n-C5H11)2O \$\$ Di-n-pentyl ether \$\$ Ether, di-n-pentyl- \$ Pentyloxypentane
- 17 26.49 0.07 C:\Database\wiley7n.l
Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester \$\$ Butyrin, 1-mono- \$.alpha ha.-Monobutyryn \$\$ Glycerol-.alpha .-mono-n-butyrate \$\$ 1-Monobutyryn
1,1-Dimethylpropyl 2-ethylhexanoate 136240 005421-13-6 36
Butanoic acid, 2-butoxy-1-methyl-2-oxoethyl ester 138170 007492-70-8 33
- 18 26.72 0.04 C:\Database\wiley7n.l
2-Furanmethanol, tetrahydro- (CAS) 9379 000097-99-4 38
\$\$ Tetrahydrofurfuryl alcohol \$\$
ALFA-TETRAHYDROFURFURYL ALCOHOL \$\$

Qo thfa \$\$ THFA \$\$ Tetrahydro-2-f
 urylmethanol \$\$ Tetrahydro-2-furan
 methanol \$\$ Tetrahydro-2-furancarbo
 inol \$\$ Tetrahydro-2-furanylmethan
 ol \$\$ Tetrahydro-
 Pentane, 1,1'-oxybis- 58300 000693-65-2 9
 2-Furanmethanol, tetrahydro- (CAS) 9378 000097-99-4 9
 \$\$ Tetrahydrofurfuryl alcohol \$\$
 ALFA-TETRAHYDROFURFURYL ALCOHOL \$\$
 Qo thfa \$\$ THFA \$\$ Tetrahydro-2-f
 urylmethanol \$\$ Tetrahydro-2-furan
 methanol \$\$ Tetrahydro-2-furancarbo
 inol \$\$ Tetrahydro-2-furanylmethan
 ol \$\$ Tetrahydro-

- 19 27.31 0.01 C:\Database\HPCH1607.L
 9.72 ISOPENTYL BUTANOATE (=ISOAMYL 327 000106-27-4 45
 BUTYRATE)
 4.60 ALLYL BUTANOATE 77 002051-78-7 4
 15.40 HEXYL BUTANOATE 78 002639-63-6 2
- 20 27.43 0.19 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 376707 000557-25-5 64
 ester
 Boric acid (H3BO3), tripentyl este 155208 000621-78-3 40
 r; Pentyl borate, (C5H11O)3B; Tria
 myl borate; Tripentyl borate; Trip
 entyl borate ((C5H11O)3B); tri-n-A
 mylborate; Boric acid, tri-n-amyl
 ester; Boric acid, tri-n-pentyl es
 ter; Tri-n-pentyl borate
 Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 376706 000557-25-5 37
 ester; .alpha.-Monobutyrim; Butyr
 in, 1-mono-; Glycerol-.alpha.-mono
 -n-butyrate; 1-Monobutyrim; Mono-n
 -butyrim; 2,3-Dihydroxypropyl buty
 rate #
- 21 28.71 21.02 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Propanoic acid, 2-methyl-, octyl e 399431 000109-15-9 53
 ster
 Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 376707 000557-25-5 40
 ester
 Boronic acid, ethyl-, bis(2,2-dime 81126 067753-47-3 33
 thylpropyl) ester; Dineopentyl eth
 ylboronate #
- 22 30.20 0.03 C:\Database\HPCH1607.L
 11.32 LINALOOL 322 000078-70-6 32
 2.85 BUTEN-1-OL<3-METHYL-2-> 340 000556-82-1 25
 45.52 ISOPHYTOL 900 000505-32-8 12
- 23 30.57 0.71 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Tributyrin; Butanoic acid, 1,2,3-p 436106 000060-01-5 56
 ropanetriyl ester; Butyrim, tri-;
 Butyryl triglyceride; Glycerin tri
 butyrate; Glycerol tributanoate; G
 lycerol tributyrate; Glyceryl trib
 utyrate; Tri-n-butyrim; Tributim;
 Tributyrin; Tributyrin glyceride;

Butyric acid tri
 Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436105 000060-01-5 40
 ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
 ol tributyrate; Butyryn; Tributin;
 Tributyrin; Tributyroin; Butyryn,
 tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
 yl triglyceride; Tributyril glycer
 ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
 l tributanoate; B
 2-DEUTERIOGLYCERYL TRIBUTANOATE 191554 054934-80-4 9

24 30.89 0.03 C:\Database\HPCH1607.L
 45.37 PHYTOL 987 000150-86-7 32
 2.85 BUTEN-1-OL<3-METHYL-2-> 340 000556-82-1 16
 18.51 CHRYSANTHENYL ACETATE<CIS-> 249 067999-48-8 14

25 31.18 0.02 C:\Database\HPCH1607.L
 29.70 EUGENOL ACETATE 848 000093-28-7 50
 24.90 ISOEUGENOL<Z-> 892 005912-86-7 38
 26.67 ISOEUGENOL<E-> 891 005932-68-3 37

26 31.75 0.01 C:\Database\wiley7n.l
 2,3-dimethyl-6-formyl--7-methoxyin 119139 000000-00-0 35
 dole
 2-Butyl-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydr 142087 000000-00-0 32
 onaphthalen-1-ol
 5-hydroxymethyl-3-methyl-3,4-dihyd 119150 113709-00-5 27
 ropyrrolo[1,2,3-de]-2H-1,4-benzoxa
 zine \$\$ Pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benz
 oxazine-5-methanol, 2,3-dihydro-3-
 methyl-, (.+-)- (CAS)

27 32.39 0.02 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436101 000060-01-5 72
 ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
 ol tributyrate; Butyryn; Tributin;
 Tributyrin; Tributyroin; Butyryn,
 tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
 yl triglyceride; Tributyril glycer
 ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
 l tributanoate; B
 Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl 436104 000060-01-5 59
 ester (CAS); Tri-n-butyryn; Glycer
 ol tributyrate; Butyryn; Tributin;
 Tributyrin; Tributyroin; Butyryn,
 tri-; Glycerin tributyrate; Butyr
 yl triglyceride; Tributyril glycer
 ide; Glyceryl tributyrate; Glycero
 l tributanoate; B
 Tributyrin; Butanoic acid, 1,2,3-p 436106 000060-01-5 50
 ropanetriyl ester; Butyryn, tri-;
 Butyryl triglyceride; Glycerin tri
 butyrate; Glycerol tributanoate; G
 lycerol tributyrate; Glyceryl trib
 utyrate; Tri-n-butyryn; Tributin;
 Tributyroin; Tributyril glyceride;
 Butyric acid tri

28 32.49 0.02 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Benzene, 1,3-diethyl- (CAS); m-Die 358338 000141-93-5 59

thylbenzene; 1,3-Diethylbenzene; Benzene, m-diethyl-; meta-Diethylbenzene; m-Ethylethylbenzene
p-Toluic acid, 2-tetrahydrofurylmethyl ester; Tetrahydro-2-furanylmethyl 4-methylbenzoate # 88116 004647-35-2 50
1,4-Cyclohexadiene, 3-ethenyl-1,2-dimethyl-; 1,2-Dimethyl-3-vinyl-1,4-cyclohexadiene # 9372 062338-57-2 38

- 29 33.17 0.13 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Tributylin; Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butylin; Glycerol tributyrate; Butylin; Tributylglyceride; Glycerin tributyrate; Glycerol tributanoate; Glycerol tributyrate; Glyceryl tributyrate; Tri-n-butylin; Tributylglyceride; Tributylglyceride; Butyric acid tri 436106 000060-01-5 90
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butylin; Glycerol tributyrate; Butylin; Tributylglyceride; Glycerin tributyrate; Butylin; Tributylglyceride; Tributylglyceride; Glyceryl tributyrate; Glycerol tributanoate; B Tributylglyceride; 436102 000060-01-5 56
- 30 34.12 6.71 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Tributylin; Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butylin; Glycerol tributyrate; Butylin; Tributylglyceride; Glycerin tributyrate; Glycerol tributanoate; Glycerol tributyrate; Glyceryl tributyrate; Tri-n-butylin; Tributylglyceride; Tributylglyceride; Butyric acid tri 436106 000060-01-5 83
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butylin; Glycerol tributyrate; Butylin; Tributylglyceride; Glycerin tributyrate; Butylin; Tributylglyceride; Tributylglyceride; Glyceryl tributyrate; Glycerol tributanoate; B 436104 000060-01-5 83
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butylin; Glycerol tributyrate; Butylin; Tributylglyceride; Glycerin tributyrate; Butylin; Tributylglyceride; Tributylglyceride; Glyceryl tributyrate; Glycerol tributanoate; B 436105 000060-01-5 83
- 31 34.83 0.05 C:\Database\wiley7n.l
1H-Pyrrolo[2,3-b]pyridine-2,6-dione, 3,3a,4,5-tetrahydro- 48483 017384-56-4 35
2-Methyl-1-hepten-6-yn-3-ol, 2-methyl-, (+-)- 21104 072867-88-0 35

- (CAS)
Propanoic acid, 2-methyl-, 4-formyl 147220 020665-85-4 27
l-2-methoxyphenyl ester \$\$ Vanillin isobutyrate

32 34.98 0.02 C:\Database\wiley7n.l
Butanoic acid, 2-butoxy-1-methyl-2-oxoethyl ester 138170 007492-70-8 36
1-(X-OCTYLOXY)-2-METHYL-2-PROPANOL 140836 000000-00-0 36
ISOBORNYL ISOVALERATE 171318 000000-00-0 36

33 35.75 0.01 C:\Database\wiley7n.l
1,4'-Bipiperidine \$\$ 4-Piperidinopiperidine 71044 004897-50-1 27
Butyric acid, p-fluorophenyl ester 89186 000587-89-3 25
1,3-Cyclopentanedione, 2-isopentyl- (CAS) \$\$ 2-Isopentyl-1,3-cyclopentanedione 70339 000827-03-2 22

34 36.60 0.02 C:\Database\wiley7n.l
Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)- 52993 000138-87-4 38
2-Methyl-1,5-hexadiene-3-ol 13649 017123-60-3 27
Cyclooctane, methoxy- (CAS) \$\$ METHOXYCYCLO-OCTANE \$\$ Ether, cyclooctyl methyl 38705 013213-32-6 16

EK 5.3

Area Percent Report

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\gas\
Data File : Method_43.D
Acq On : 15 Jun 2007 3:52
Operator :
Sample : 3
Misc :
ALS Vial : 14 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: AUTOINT1.E
Integrator: ChemStation

Method : C:\MSDCHEM\1\METHODS\FAMECARBOWAX.M
Title :

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % area	% of max.	% total
1	1.212	202	216	228	BB	15265	178174	0.03%	0.013%	
2	1.385	241	249	290	BB	3213413	38104802	5.40%	2.698%	
3	2.081	357	382	397	BB	43121	534394	0.08%	0.038%	
4	2.332	422	430	448	BB	33467	540813	0.08%	0.038%	
5	2.945	510	547	641	BB	8532919	705608359	100.00%	49.962%	
6	3.646	667	681	702	BB	41709	852647	0.12%	0.060%	
7	4.856	832	912	1001	BB	29502	4737323	0.67%	0.335%	
8	7.238	1356	1367	1389	BB	12700	355431	0.05%	0.025%	
9	12.562	2272	2384	2393	BB 5	3130	-27676	-0.00%	-0.002%	
10	12.803	2412	2430	2442	BB 4	24084	571841	0.08%	0.040%	
11	14.877	2442	2826	2832	BB	4934	-5492635	-0.78%	-0.389%	
12	15.196	2832	2887	2894	BB 3	29802	-1945193	-0.28%	-0.138%	
13	16.531	2994	3142	3149	BB 4	11659	-2927772	-0.41%	-0.207%	
14	17.301	3149	3289	3363	BB	222166	49412596	7.00%	3.499%	
15	19.683	3706	3744	3762	BB 2	14507	325072	0.05%	0.023%	
16	20.809	3780	3959	3964	BB 2	61992	-235056871	-33.31%	-16.644%	
17	20.924	3963	3981	4057	BB 2	304045	26080170	3.70%	1.847%	
18	21.594	4075	4109	4121	BB	263595	11266696	1.60%	0.798%	
19	22.212	4122	4227	4313	BB 2	1776211	335846007	47.60%	23.780%	
20	24.379	4592	4641	4657	BB	1450083	72519510	10.28%	5.135%	
21	26.510	5021	5048	5076	BB 4	15339	877098	0.12%	0.062%	
22	26.719	5076	5088	5104	BB	45306	1096401	0.16%	0.078%	
23	27.295	5171	5198	5208	BB	12427	317437	0.04%	0.022%	
24	27.421	5209	5222	5254	BB 2	112225	4261346	0.60%	0.302%	
25	28.625	5399	5452	5516	BB	4209562	348969473	49.46%	24.710%	
26	30.191	5740	5751	5768	BB 3	27623	745356	0.11%	0.053%	
27	30.557	5806	5821	5854	BB	489605	12953981	1.84%	0.917%	
28	30.871	5855	5881	5923	BB 2	61749	1709725	0.24%	0.121%	
29	31.170	5925	5938	5947	BB	24357	563967	0.08%	0.040%	
30	31.740	6035	6047	6063	BB 6	10035	327999	0.05%	0.023%	
31	32.489	6178	6190	6207	BB 5	14335	331502	0.05%	0.023%	

32	33.191	6307	6324	6345	BB 2	38812	1536999	0.22%	0.109%
33	34.070	6472	6492	6514	BB	1297146	33171997	4.70%	2.349%
34	34.829	6625	6637	6653	BB 2	54292	1364248	0.19%	0.097%
35	34.971	6652	6664	6684	BB 2	24158	627565	0.09%	0.044%
36	35.740	6759	6811	6817	BB	15686	93035	0.01%	0.007%
37	35.808	6817	6824	6834	BB 2	27119	605988	0.09%	0.043%
38	36.604	6961	6976	6990	BB	49933	1239393	0.18%	0.088%

Library Search Report

Data Path : C:\MSDCHEM\1\DATA\gas\
 Data File : Method_43.D
 Acq On : 15 Jun 2007 3:52
 Operator :
 Sample : 3
 Misc :
 ALS Vial : 14 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\HPCH1607.L Minimum Quality: 30
 C:\Database\Wiley7Nist05.L Minimum Quality: 50
 C:\Database\wiley7n.l

Unknown Spectrum: Apex
 Integration Events: Chemstation Integrator - AUTOINT1.E

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	1.21	0.01	C:\Database\wiley7n.l			
			methylethyl ether	806	000000-00-0	4
			Hydrazine, 1,1-dimethyl-	742	000057-14-7	4
			ethylhydrazine			
			ine			
			N,N-Dimethylhydrazine			
			1,1-Dimethylhydrazine			
			2			
			methylhydrazine,unsymmetrical			
			imethylhydrazine			
			Hydrazine, 1,1-dimethyl-	744	000057-14-7	4
2	1.38	2.70	C:\Database\wiley7n.l			
			N-Nitrosodimethylamine	1911	000062-75-9	7
			ine, N-methyl-N-nitroso-			
			ylamine, N-nitroso-			
			rosamine			
			so-N,N-Dimethylamine			
			\$\$\$ Dimethylnitrosamine			
			itrosoamine			
			ethanamine			
			Thiirane, methyl- (CAS)	2006	001072-43-1	7
			ne sulfide			
			,2-Epithiopropene			
			sulfide			
			\$ Methylthiirane			
			thyl-			
			\$\$\$ 2-Methylthiacyclopropane			
			\$\$\$ 2-Methylthiirane			
			ulphide			
			Methanamine, N-methyl-N-nitroso-	1913	000062-75-9	7
			(CAS) \$\$\$ Dimethylnitrosamine			

\$\$ DMNA \$\$ N-Nitrosodimethylamine
 \$\$ Dimethylamine, N-nitroso- \$\$ N
 -Nitroso-N,N-dimethylamine \$\$ N-me
 thyl-N-nitrosomethanamine \$\$ (CH3)
 2NNO \$\$ Dimethylnitrosamin \$\$ Dime
 thylnitrosoamine

- 3 2.08 0.04 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Benzene 337352 000071-43-2 91
 Benzene (CAS); Phene; Benzol; Benz 337360 000071-43-2 91
 ole; Pyrobenzol; [6]Annulene; Pyro
 benzole; Coal naphtha; Phenyl hydr
 ide; Cyclohexatriene; Benzolene; B
 icarburet of hydrogen; Carbon oil;
 Mineral naphtha; Motor benzol; Be
 nzeen; Benzen; Benzin; Benzine; Be
 nzolo; Fenzen; Ni
 Benzene (CAS); Phene; Benzol; Benz 337355 000071-43-2 91
 ole; Pyrobenzol; [6]Annulene; Pyro
 benzole; Coal naphtha; Phenyl hydr
 ide; Cyclohexatriene; Benzolene; B
 icarburet of hydrogen; Carbon oil;
 Mineral naphtha; Motor benzol; Be
 nzeen; Benzen; Benzin; Benzine; Be
 nzolo; Fenzen; Ni
- 4 2.33 0.04 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Propanoic acid, 2-methyl-, methyl 343193 000547-63-7 91
 ester (CAS); Methyl isobutyrate; M
 ethyl isobutanoate; Methyl 2-methy
 lpropanoate; Methyl 2-methylpropio
 nate; Isobutyric acid, methyl este
 r; (CH3)2CHC(O)OCH3; Methylester k
 yseliny isomaselne; Methyl isobuty
 rate; Methyl iso-
 Propanoic acid, 2-methyl-, methyl 343185 000547-63-7 90
 ester (CAS); Methyl isobutyrate; M
 ethyl isobutanoate; Methyl 2-methy
 lpropanoate; Methyl 2-methylpropio
 nate; Isobutyric acid, methyl este
 r; (CH3)2CHC(O)OCH3; Methylester k
 yseliny isomaselne; Methyl isobuty
 rate; Methyl iso-
 Propanoic acid, 2-methyl-, methyl 343184 000547-63-7 90
 ester; Isobutyric acid, methyl est
 er; Methyl isobutyrate; Methyl 2-m
 ethylpropanoate; Methyl 2-methylpr
 opionate; (CH3)2CHC(O)OCH3; Methyl
 isobutanoate; Methylester kyseliny
 isomaselne; Methyl iso-buturate
- 5 2.94 49.96 C:\Database\HPCH1607.L
 2.43 METHYL BUTANOATE 76 000623-42-7 91
 3.55 METHYL PENTANOATE (=METHYL V 1143 000624-24-8 23
 ALERATE)
 8.57 METHYL HEPTANOATE (= METHYL 1135 000106-73-0 9
 ENANTHATE)
- 6 3.65 0.06 C:\Database\HPCH1607.L
 20.64 ISOAMYL BENZYL ETHER (=ISOP 878 000122-73-6 45

ENTYL BENZYL ETHE
19.73 SABINYL ACETATE<TRANS-> (TRA 1412 053833-85-5 36
NS for Ac vs. IPP)
10.09 TOLUALDEHYDE<OTRHO-> 1555 000529-20-4 9

- 7 4.86 0.34 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Butanoic acid (CAS); n-Butyric aci 339216 000107-92-6 90
d; Butyric acid; 1-Butyric acid; n
-Butanoic acid; Ethylacetic acid;
Propylformic acid; 1-Propanecarbox
ylic acid; ETHYL ACETIC ACID; n-C3
H7COOH; Propanecarboxylic acid; Bu
tanic acid; Buttersaeure; IMET 339
3; Kyselina masel
Butanoic acid (CAS); n-Butyric aci 339211 000107-92-6 90
d; Butyric acid; 1-Butyric acid; n
-Butanoic acid; Ethylacetic acid;
Propylformic acid; 1-Propanecarbox
ylic acid; ETHYL ACETIC ACID; n-C3
H7COOH; Propanecarboxylic acid; Bu
tanic acid; Buttersaeure; IMET 339
3; Kyselina masel
Butanoic acid; Butyric acid; n-But 339219 000107-92-6 90
anoic acid; n-Butyric acid; Ethyla
cetic acid; Propylformic acid; 1-B
utyric acid; 1-Propanecarboxylic a
cid; n-C3H7COOH; Propanecarboxylic
acid; Butanic acid; Buttersaeure;
IMET 3393; Kyselina maselna; UN 2
820
- 8 7.24 0.03 C:\Database\Wiley7Nist05.L
4-Heptanone 347841 000123-19-3 86
4-Heptanone 347840 000123-19-3 78
4-Heptanone; Butyryne; Dipropyl ke 347842 000123-19-3 78
tone; GBL; Propyl Ketone; (n-C3H7)
2CO; Heptan-4-one; Di-n-propyl ket
one; UN 2710
- 9 12.56 -0.00 C:\Database\wiley7n.l
Thiodiglycol 19488 000111-48-8 9
Propane, 2-fluoro-2-methyl- (CAS) 2395 000353-61-7 9
\$\$ 2-Fluoro-2-methylpropane \$\$ ter
t-Butyl fluoride
Methane, nitro- (CAS) \$\$ Nitrometh 834 000075-52-5 4
ane \$\$ Nitrocarbol \$\$ CH3NO2 \$\$ Ni
trometan \$\$ UN 1261
- 10 12.80 0.04 C:\Database\wiley7n.l
Geranyl acetate \$\$ 2,6-Octadien-1- 109434 000105-87-3 16
ol, 3,7-dimethyl-, acetate, (E)- (
CAS) \$\$ Geraniol acetate \$\$ Bay pi
ne (oyster) oil \$\$ Acetic acid ger
aniol ester \$\$ trans-3,7-Dimethyl-
2,6-octadien-1-yl acetate \$\$ Geran
yl ethanoate \$\$ Acetic acid, geran
iol ester \$\$ tran
Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methyl 109502 010198-23-9 14
ethenyl)-, acetate \$\$ p-Menth-8-en
-1-ol, acetate \$\$.beta.-Terpinyl

acetate
.BETA.-TERPINYL ACETATE \$\$ BETA-TE 112832 000000-00-0 14
RPINYL ACETATE

- 11 14.88 -0.39 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Glycerin 340087 000056-81-5 64
Glycerin 340088 000056-81-5 43
1,2,3-Propanetriol (CAS); Glycerol 340086 000056-81-5 9
; Glyrol; Glycerin; Osmoglyn; Glys
anin; Glycerine; Glyceritol; Glycy
l alcohol; Trihydroxypropane; Prop
anetriol; Glycerin suppositories;
1,2,3-Trihydroxypropane; Propantri
ol; Synthetic glycerin; 90 Technic
al glycerin; Dagr
- 12 15.20 -0.14 C:\Database\wiley7n.l
Glycerin 5458 000056-81-5 25
1,2,3-Propanetriol (CAS) \$\$ Glycer 5456 000056-81-5 25
ol \$\$ Glyrol \$\$ Glycerin \$\$ Osmogl
yn \$\$ Glysarin \$\$ Glycerine \$\$ Gly
ceritol \$\$ Glycyl alcohol \$\$ Trihy
droxypropane \$\$ Propanetriol \$\$ Gl
ycerin suppositories \$\$ 1,2,3-Trih
ydroxypropane \$\$ Propantriol \$\$ Sy
nthetic glycerin
Methane, nitro- (CAS) \$\$ Nitrometh 834 000075-52-5 9
ane \$\$ Nitrocarbolic acid \$\$ CH3NO2 \$\$ Ni
trotrometan \$\$ UN 1261
- 13 16.53 -0.21 C:\Database\Wiley7Nist05.L
1,2,3-Propanetriol (CAS); Glycerol 340091 000056-81-5 64
; Glyrol; Glycerin; Osmoglyn; Glys
anin; Glycerine; Glyceritol; Glycy
l alcohol; Trihydroxypropane; Prop
anetriol; Glycerin suppositories;
1,2,3-Trihydroxypropane; Propantri
ol; Synthetic glycerin; 90 Technic
al glycerin; Dagr
Glycerin 340087 000056-81-5 64
Glycerin 340088 000056-81-5 43
- 14 17.30 3.50 C:\Database\Wiley7Nist05.L
1,2,3-Propanetriol (CAS); Glycerol 340091 000056-81-5 64
; Glyrol; Glycerin; Osmoglyn; Glys
anin; Glycerine; Glyceritol; Glycy
l alcohol; Trihydroxypropane; Prop
anetriol; Glycerin suppositories;
1,2,3-Trihydroxypropane; Propantri
ol; Synthetic glycerin; 90 Technic
al glycerin; Dagr
Glycerin 340088 000056-81-5 43
Propane, 2-fluoro-2-methyl- (CAS); 337260 000353-61-7 9
2-Fluoro-2-methylpropane; tert-Bu
tyl fluoride
- 15 19.68 0.02 C:\Database\wiley7n.l
Ethanethioamide, N,N-dimethyl- (CA 9865 000631-67-4 9
S) \$\$ THIOACETIC ACID DIMETHYLAMID
E \$\$ N,N-Dimethylthioacetamide \$\$

Dimethylthioacetamide \$\$ Acetamide
 , N,N-dimethylthio- \$\$ Dimethylthio
 oacetamid
 Ethanethioamide, N,N-dimethyl- 9867 000631-67-4 9
 1,2,3-Propanetriol, 1-acetate \$\$ A 29035 000106-61-6 9
 cetin, 1-mono- \$\$.alpha.-Monoacet
 in \$\$ Glycerol .alpha.-monoacetate
 \$\$ 1-Monoacetin \$\$ 2,3-Dihydroxyp
 ropyl acetate \$\$ Acetic acid, mono
 glyceride \$\$ Acetin \$\$ Glycerol mo
 noacetate \$\$ Glycerol 1-acetate \$\$
 Glycerol 1-monoa

- 16 20.81 -16.64 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 376707 000557-25-5 59
 ester
 Butanoic acid, propyl ester (CAS); 355875 000105-66-8 28
 Propyl butyrate; Propyl butanoate
 ; Propyl n-butyrate; n-Propyl buty
 rate; n-Propyl n-butyrate; Butyric
 acid, propyl ester; Propyl ester
 of butanoic acid; n-Butyric acid n
 -propyl ester; Propylester kyselini
 y maselne; BUTTER
 Ethane-1,1-diol dibutanoate; 1-(Bu 65803 025572-25-2 17
 tyryloxy)ethyl butyrate #
- 17 20.92 1.85 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 376707 000557-25-5 59
 ester
 methyl furfuryloxyacetate 14370 000000-00-0 32
 Butanoic acid, propyl ester (CAS); 355875 000105-66-8 28
 Propyl butyrate; Propyl butanoate
 ; Propyl n-butyrate; n-Propyl buty
 rate; n-Propyl n-butyrate; Butyric
 acid, propyl ester; Propyl ester
 of butanoic acid; n-Butyric acid n
 -propyl ester; Propylester kyselini
 y maselne; BUTTER
- 18 21.59 0.80 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 376707 000557-25-5 50
 ester
 methyl furfuryloxyacetate 14370 000000-00-0 37
 Propanoic acid, 2-methyl-, 2-methy 364594 000097-85-8 33
 lpropyl ester (CAS); Isobutyl isob
 utyrate; ISOBUTYL ISOBUTANOATE; IS
 OBUTYL 2-METHYLPROPANOATE; ISOBUTY
 L ESTER OF ISOBUTYRIC ACID; 2-Meth
 ylpropyl isobutyrate; Isobutyric a
 cid, isobutyl ester; 2-Methylpropy
 l 2-methylpropano
- 19 22.21 23.78 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 2-Ethylhexyl ester of butanoic aci 399427 025415-84-3 50
 d; Butanoic acid, 2-ethylhexyl est
 er; 2-Ethylhexyl butyrate; 2-ethyl
 hexyl butyrate; n-Butyric acid 2-e
 thylhexyl ester; 2-Ethylhexyl buty
 rate #; 2-Ethylhexyl butyrate (com

puter-generated name)
Butanoic acid, 1-methylbutyl ester 374768 060415-61-4 39
; Butyric acid, sec-pentyl ester;
sec-Amyl butyrate; UN 2620; Butano
ic acid, 2-pentyl ester; 1-Methylb
utyl butyrate #
Butanoic acid, 1-methylbutyl ester 374756 060415-61-4 39

- 20 24.38 5.13 C:\Database\wiley7n.l
Pentane, 1,1'-oxybis- 58299 000693-65-2 9
Methyl 1-Ethenylbutyl Ether 15566 000000-00-0 9
Pentane, 1,1'-oxybis- \$\$ Pentyl et 58298 000693-65-2 9
her \$\$ n-Amyl ether \$\$ n-Pentyl et
her \$\$ Amyl ether \$\$ Di-n-amyl eth
er \$\$ Diamyl ether \$\$ Dipentyl eth
er \$\$ (n-C5H11)2O \$\$ Di-n-pentyl e
ther \$\$ Ether, di-n-pentyl- \$\$ Pen
tyloxyptane
- 21 26.51 0.06 C:\Database\wiley7n.l
Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 61642 000557-25-5 40
ester \$\$ Butyryn, 1-mono- \$\$.alp
ha.-Monobutyryn \$\$ Glycerol-.alpha
-mono-n-butyrate \$\$ 1-Monobutyryn
Cyclopentanol, 1-methyl- (CAS) \$\$ 8669 001462-03-9 38
1-Hydroxy-1-methylcyclopentane \$\$
1-Methylcyclopentanol \$\$ 1-Methyl-
1-cyclopentanol
ISO AMYL BUTYRATE 57958 000106-27-4 38
- 22 26.72 0.08 C:\Database\wiley7n.l
2-Furanmethanol, tetrahydro- (CAS) 9381 000097-99-4 38
\$\$ Tetrahydrofurfuryl alcohol \$\$
ALFA-TETRAHYDROFURFURYL ALCOHOL \$\$
Qo thfa \$\$ THFA \$\$ Tetrahydro-2-f
urylmethanol \$\$ Tetrahydro-2-furan
methanol \$\$ Tetrahydro-2-furancarb
inol \$\$ Tetrahydro-2-furanylmethan
ol \$\$ Tetrahydro-
Hexanoic acid, 3-oxo-, ethyl ester 57442 003249-68-1 9
Oxirane, 3-hydroxypropyl- 9426 000000-00-0 9
- 23 27.30 0.02 C:\Database\Wiley7Nist05.L
1,2-Dibutyroxy-1-ethoxyethane; 2-(121310 013264-32-9 50
Butyryloxy)-1-ethoxyethyl butyrate

Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 376706 000557-25-5 43
ester; .alpha.-Monobutyryn; Butyr
in, 1-mono-; Glycerol-.alpha.-mono
-n-butyrate; 1-Monobutyryn; Mono-n
-butyryn; 2,3-Dihydroxypropyl buty
rate #
Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 376707 000557-25-5 40
ester
- 24 27.42 0.30 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Butanoic acid, 2,3-dihydroxypropyl 376706 000557-25-5 64
ester; .alpha.-Monobutyryn; Butyr
in, 1-mono-; Glycerol-.alpha.-mono
-n-butyrate; 1-Monobutyryn; Mono-n

- 29.70 EUGENOL ACETATE 848 000093-28-7 50
31.51 ISOEUGENOL ACETATE<Z-> 889 097412-23-2 40
- 30 31.74 0.02 C:\Database\Wiley7Nist05.L
2-Guanidino-4(3H)-quinazolinone 66977 062936-92-9 53
Benzoic acid, 4-(3-hydroxy-3-methyl-1-butynyl)-, methyl ester; Methyl 4-(3-hydroxy-3-methyl-1-butynyl) benzoate #
Benzene, 4-ethyl-1,2-dimethyl- 358372 000934-80-5 18
- 31 32.49 0.02 C:\Database\Wiley7Nist05.L
tricyclo[5.3.0.0(2,8)]deca-4-en; Tricyclo[5.3.0.0(2,8)]dec-4-ene (CAS) 9305 083298-53-7 59
HOTRIENYL ACETATE 57410 000000-00-0 59
Benzene, 1,3-diethyl- (CAS); m-Diethylbenzene; m-Diethylbenzene; Benzene, m-diethyl-; meta-Diethylbenzene; m-Ethylethylbenzene
- 32 33.19 0.11 C:\Database\wiley7n.l
1,4-Cyclohexadiene, 3-ethenyl-1,2-dimethyl- 29976 062338-57-2 30
Cyclooctane, methoxy- Ether, cyclooctyl methyl Methoxycyclooctane 38703 013213-32-6 27
Isophytol 1-Hexadecen-3-ol, 3,7,11,15-tetramethyl- 245675 000505-32-8 27
- 33 34.07 2.35 C:\Database\Wiley7Nist05.L
Tributylin; Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butyrin; Glycerol tributyrate; Butyrin; Tributyl butyrate; Glycerol tributanoate; Glycerol tributyrate; Glyceryl tributyrate; Tri-n-butyrin; Tributyl; Tributyrin; Tributyrin; Tributyl glyceride; Butyric acid tri
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butyrin; Glycerol tributyrate; Butyrin; Tributyl; Tributyrin; Tributyrin; Butyrin, tri-; Glycerin tributyrate; Butyl triglyceride; Tributyl glyceride; Glyceryl tributyrate; Glycerol tributanoate; B
Butanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester (CAS); Tri-n-butyrin; Glycerol tributyrate; Butyrin; Tributyl; Tributyrin; Tributyrin; Butyrin, tri-; Glycerin tributyrate; Butyl triglyceride; Tributyl glyceride; Glyceryl tributyrate; Glycerol tributanoate; B
- 34 34.83 0.10 C:\Database\wiley7n.l
2,3,4,5-TETRAHYDROBENZOXEPIN-2,2,3,3-D4 1-Benzoxepin-2,3-d2, 2,3,4,5-tetrahydro-2,3-d2- (CAS) 44490 041807-16-3 30
Tricyclo[4.2.1.1(2,5)]decan-9-ol, 50157 066953-30-8 30

stereoisomer
 Benzene, 1,2-dimethoxy-4-methyl- \$ 49038 000494-99-5 27
 \$ 3,4-Dimethoxytoluene \$\$ Homovera
 tole \$\$ Toluene, 3,4-dimethoxy- \$
 \$ 1,2-Dimethoxy-4-methylbenzene \$\$
 4-Methyl-1,2-dimethoxybenzene \$\$
 4-Methylveratrol \$\$ 4-Methylveratr
 ole

35 34.97 0.04 C:\Database\wiley7n.l
 Butanoic acid, 2-hexenyl ester, (E 73455 053398-83-7 9
)- \$\$ trans-2-Hexenyl Butyrate
 Tributyrin 251652 000060-01-5 9
 Furan, 2-butyltetrahydro- 24962 001004-29-1 9

36 35.74 0.01 C:\Database\wiley7n.l
 Piperidine, 1,2,6-trimethyl-, cis- 23786 002439-13-6 22
 \$\$ cis-1,2,6-Trimethylpiperidine
 \$\$ N-Methyl-cis-2,6-dimethylpiperi
 dine \$\$ 1,2,6-Trimethylpiperidine
 Piperidine, 1,2,6-trimethyl-, cis- 23787 002439-13-6 22
 (CAS) \$\$ CIS N,2,6,-TRIMETHYLPIPE
 RIDINE \$\$ cis-1,2,6-Trimethylpiper
 idine \$\$ N-Methyl-cis-2,6-dimethyl
 piperidine \$\$ 1,2,6-Trimethylpiper
 idine
 Cyclooctane, methoxy- 38704 013213-32-6 14

37 35.81 0.04 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 tricyclo[5.3.0.0(2,8)]deca-4-en; T 9305 083298-53-7 59
 ricyclo[5.3.0.02,8]dec-4-ene (CAS)
 Isonicotinic acid, 2-tetrahydrofur 72268 000000-00-0 32
 ylmethyl ester
 3-Cyclopentylpropionic acid, 2-tet 96558 000000-00-0 27
 rahydrofurylmethyl ester; Tetrahyd
 ro-2-furanylmethyl 3-cyclopentylpr
 opanoate #

38 36.60 0.09 C:\Database\Wiley7Nist05.L
 tricyclo[5.3.0.0(2,8)]deca-4-en; T 9305 083298-53-7 50
 ricyclo[5.3.0.02,8]dec-4-ene (CAS)
 2,6-Dimethyl-2,6-octadiene-1,8-dio 422009 036052-53-6 22
 l diacetate
 methyl acetophenone (o, m and p) 9230 000000-00-0 22