

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ETİL LAKTATIN LİPAZ KATALİZÖRLÜĞÜNDE ÜRETİMİ İÇİN
BİYOPROSES PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ**

Azime ARIKAYA

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2018

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI


Azime ARIKAYA tarafından hazırlanan “Etil Laktatın Lipaz Katalizörlüğünde Üretimi İçin Biyoproses Parametrelerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 18/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

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

Jüri Üyeleri:

Başkan : Prof. Dr. Yeşim SAĞ AÇIKEL 
Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

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

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

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN

Enstitü Müdürü

ETİK

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

18/07/2018



Azime ARIKAYA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ETİL LAKTATIN LİPAZ KATALİZÖRLÜĞÜNDE ÜRETİMİ İÇİN BİYOPROSES PARAMETRELERİNİN İNCELENMESİ

Azime ARIKAYA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Z. Serpil TAKAÇ

Çalışmada, Novozym 435 lipaz enzimi katalizörlüğünde ve derin ötektik çözücü (DES) ortamında, laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonu ile etil laktat üretiminde biyoproses parametreleri incelenmiştir. Esterleşme tepkimesi izoterm koşullarda çalkalamalı hava banyosunda gerçekleştirilmiş ve girdi ve ürün analizleri HPLC cihazında yapılmıştır. İncelenen parametrelerin reaksiyon başlangıç hızı, dönüşüm ve verime etkileri araştırılmıştır. Hazırlanan DES'lerden yüksek başlangıç reaksiyon hızlarından birinin elde edildiği kolin klorür-gliserol (ChCl-Gly (mol oranı: 1:2)) reaksiyon ortamı olarak seçilmiştir. DES:su ikili karışımında gerçekleştirilen deneylerde en yüksek başlangıç reaksiyon hızının elde edildiği % 10 (h/h) su içeriğinde çalışılmıştır. En uygun başlangıç laktik asit ve etanol derişimleri sırasıyla 3 M ve 5 M olarak bulunmuştur. Yüksek derişimlerde etanol inhibisyonu gözlenmiştir. Enzim derişimi, sıcaklık ve karıştırma hızının en uygun değerleri, başlangıç reaksiyon hızı, dönüşüm ve verim dikkate alınarak sırasıyla 30 mg/mL, 50 °C ve 200 rpm olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda ulaşılan en yüksek başlangıç reaksiyon hızı 13.81 µmol/gdk'dır. 72 saat sonunda elde edilen dönüşüm ve verim değerleri ise sırasıyla % 29.47 ve 28.68'dir. DES:su ikili karışımında laktik asitin etanol ile lipaz katalizli esterleşme reaksiyonunda dış yayılım ve iç yayılım etkilerinin ihmal edilebilir olduğu bulunmuştur. Tepkime için etanol inhibisyonlu Ping-Pong Bi-Bi mekanizmasına uyan kinetik model önerilmiş ve verilerin model ile uyumu gösterilmiştir. Tepkime aktivasyon enerjisi 43.28 kJ/mol olarak hesaplanmıştır. Çalışmada ayrıca, dönüşümü artırmak amacıyla oluşan etil laktatın reaksiyon ortamından hidrofobik bir ekstraksiyon fazına geçtiği ve ekstraksiyon fazı olarak yeşil çözücülerin kullanıldığı bir ekstraktif reaksiyon sistemi de kullanılmıştır.

Temmuz 2018, 81 sayfa

Anahtar Kelimeler: Etil laktat, laktik asit, lipaz, yeşil çözücü, derin ötektik çözücü

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF BIOPROCESS PARAMETERS FOR THE LIPASE CATALYSED PRODUCTION OF ETHYL LACTATE

Azime ARIKAYA

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

Supervisor: Prof. Dr. Z. Serpil TAKAÇ

Bioprocess parameters for the production of ethyl lactate by esterification of lactic acid with ethanol using Novozym 435 lipase enzyme in deep eutectic solvents (DESs) were investigated. Esterification reaction was performed in a shaking incubator under isothermal conditions where substrate and product analyses were done by a HPLC. The effects of parameters on the initial reaction rate, conversion and yield were investigated. Among DESs prepared, choline chloride-glycerol (ChCl-Gly (mol ratio: 1:2)), which provided high initial reaction rate, was selected as the reaction medium. In the experiments performed in DES:water binary mixture, water content was kept 10 % (v/v) where the highest initial reaction rate was obtained. The optimum initial lactic acid and ethanol concentrations were found to be 3 M and 5 M, respectively. Ethanol inhibition was observed at high concentrations. The optimum enzyme concentration, temperature and agitation rate were determined as 30 mg/mL, 50 °C ve 200 rpm, considering the initial reaction rate, conversion and yield. The highest initial reaction rate was obtained as 13.81 $\mu\text{mol/gmin}$ under optimum conditions. After 72 hours, conversion and yield values obtained were 29.47 % and 28.68 %, respectively. For the lipase catalyzed esterification of lactic acid with ethanol in DES:water binary mixture, it was found that the external and internal mass transfer limitations were negligible. A kinetic model that obeys the Ping-Pong Bi-Bi mechanism with ethanol inhibition was suggested and found to be compatible with the experimental data. The activation energy of the reaction was calculated as 43.28 kJ/mol. In the study, the extractive reaction system was also carried out to increase conversion by extracting ethyl lactate to a hydrophobic extraction phase where green solvents were used as extraction phase.

July 2018, 81 pages

Key Words: Ethyl lactate, lactic acid, lipase, green solvent, deep eutectic solvent

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bilgisini, ilgisini benden esirgemeyen, akademik ilerlemek istediğim bu yolda bana hep ışık tutan, her zaman sevgisini hissettiğim, her zaman saygı duyduğum ve duyacağım değerli hocam Prof. Dr. Serpil TAKAÇ'a (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) teşekkür etmek istiyorum. Bana olan desteğinizi hep hissettim ve ileride de desteğinizi benden esirgemeyeceğinizden eminim. Sizinle çalışmak çok özel ve güzeldi.

Laboratuvarında uzun günler geçirdiğimiz ve çok şey paylaştığımız, yüksek lisans çalışmamın her anında yanımda olan, desteğini benden maddi manevi asla esirgemeyen ve her zaman sevip saygı duyacağım değerli hocam Dr. Ayşe Ezgi ÜNLÜ BÜYÜKTOPÇU'ya (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) teşekkür etmek istiyorum. Umarım sizinle tekrar çalışma fırsatımız olur.

Çalışmam boyunca bana hep destek ve yardımcı olan Didem DEĞİRMENBAŞI'na, Ceren ÜLGER'e, Dr. Alper KARAKAYA'ya, Aybike ALTUNDAĞ'a ve sevgili arkadaşım Fatma Elif UZUN'a yanımda oldukları için teşekkür ediyorum.

Tez çalışmamın dahil olduğu 'Yeni ve Çevre Dostu Bir Ekstraktif Reaksiyon Prosesi ile Etil Laktat Üretimi (117M884)' isimli projede, proje bursiyeri olarak beni destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ediyorum.

Son olarak her zaman yanımda olan, beni her zaman destekleyen, her türlü derdimi, sıkıntımı dinleyip hep başarılı olmamı dileyen, bunun için ellerinden gelen herşeyi yapan ve buralara gelmemi sağlayan canım ailem, canım babam Ömer ARIKAYA, canım annem Tülay ARIKAYA ve abla sevgisi hissettiren canım kardeşlerim Şeyma ARIKAYA ve Sema ARIKAYA'ya teşekkür ediyor ve benimle oldukları için şükrediyorum. Her türlü üzüntümde, sıkıntıda ve mutluluğumda hep siz vardınız. Sizi çok seviyorum. İyi ki varsınız.

Azime ARIKAYA

Ankara, Temmuz 2018

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1 Etil Laktat.....	3
2.2 Etil Laktat Üretim Prosesleri.....	5
2.3 Ekstraktif Reaksiyon ile Etil Laktat Üretimi	12
2.4 Yeşil Çözücüler.....	13
2.4.1 Derin ötektik çözücüler	14
2.4.2 Biyoçözücüler.....	17
2.5 Enzimatik Etil Laktat Üretim Kinetiği.....	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	22
3.1 Materyal.....	22
3.2 Yöntem	23
3.2.1 Çözücü hazırlanması	23
3.2.2 Esterleşme tepkimesi.....	24
3.2.3 Ekstraktif reaksiyon sistemi	26
3.2.4 Analizler	27
3.2.4.1 HPLC analizleri	27
3.2.4.2 Lipaz aktivite tayini	28
3.2.4.3 Elektriksel iletkenlik ölçümü	28
3.2.4.4 Vizkosite ölçümü	29
3.2.4.5 pH ölçümü.....	29
3.2.4.6 Yoğunluk ölçümü	29
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	30
4.1 Derin Ötektik Çözücü Ortamında Laktik Asitin Etanol ile Esterleşme Tepkimesi.....	30

4.1.1	Reaksiyon ortamı için uygun derin ötektik çözücü seçimi	30
4.1.2	Su içeriği etkisi.....	34
4.1.3	Başlangıç girdi derişimleri etkisi	35
4.1.4	Enzim derişimi etkisi.....	39
4.1.5	Sıcaklık etkisi	42
4.1.6	Karıştırma hızı etkisi	44
4.2	Derin Ötektik Çözücü Ortamında Laktik Asitin Etanol ile Esterleşme Tepkimesi Kinetiği.....	46
4.2.1	Dış yayılım etkisi	46
4.2.2	İç yayılım etkisi.....	47
4.2.3	Tepkime kinetik modeli	51
4.2.4	Tepkime aktivasyon enerjisi.....	53
4.3	Ekstraktif Reaksiyon Sisteminde Laktik Asitin Etanol ile Esterleşme Tepkimesi.....	54
4.3.1	Hidrofobik çözücü seçimi	55
4.3.2	Ekstraktif reaksiyon sisteminde etil laktat üretimi.....	56
5.	SONUÇ	59
	KAYNAKLAR	64
	EKLER.....	72
	EK 1 Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Modelleri	73
	EK 2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler	74
	EK 3 Laktik Asit, Etil Laktat ve Oligomerlerinin HPLC Kromotogramları.....	75
	EK 4 Reaksiyon Ortamının HPLC Kromotogramı	76
	EK 5 Laktik Asit ve Etil Laktatın Kantitatif HPLC Analizleri.....	77
	EK 6 HPLC Analizlerinin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği	78
	EK 7 En Uygun Koşullarda Gerçekleştirilen Laktik Asitin Etanol ile Lipaz Katalizli Esterleşme Reaksiyonunun Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği.....	80
	ÖZGEÇMİŞ.....	81

SİMGELER DİZİNİ

A	Absorbans
A_P	Enzim pelletinin yüzey alanı, cm^2
C_A	Girdi derişimi, mol/L
C_E	Enzim derişimi, mg/mL
C_{LA0}	Başlangıç laktik asit monomer derişimi, mol/L
C_{LA20}	Başlangıç laktik asit dimer derişimi, mol/L
C_{LA30}	Başlangıç laktik asit trimer derişimi, mol/L
C_S	Substrat derişimi, mol/L
C_{S0}	Enzim yüzeyindeki substrat derişimi, mol/L
cm	Santimetre
cP	Santipuar
D_E	Etkin yayınım katsayısı, cm^2/st
dk	Dakika
D_S	Substrat difüzivitesi, cm^2/s
E_A	Aktivasyon enerjisi, kJ/mol
g	Gram
k	Sabit
K	Kelvin
kg	Kilogram
K_A, K_B	Girdilerin Michaelis-Menten sabitleri, mol/L
kJ	Kilojoule
K_{iA}, K_{iB}	Substrat inhibisyon sabitleri, mol/L
K_m	Michaelis-Menten sabiti, mol/L
L	Litre
L_{ads}	Adsorbent hacmi, L
logP	Dağılım katsayısı
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mPa	Milipascal
mS	Milisiemens
n	Örnek sayısı
N	Karıştırma hızı, rpm
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
PVDF	Polivinilidin diflorür
pH	Hidrojen derişiminin eksi logaritması

pKa	Asitlik sabitinin eksi logaritması
r	Tepkime hızı, mol/Lst, $\mu\text{mol/gdk}$
R	İdeal gaz sabiti, J/molK
r_{max}	Maksimum tepkime hızı, mol/Lst, $\mu\text{mol/gdk}$
r_0	Başlangıç tepkime hızı, mol/Lst, $\mu\text{mol/gdk}$
R_p	Enzim pelletinin yarıçapı, cm
rpm	Devir/dakika
s	Saniye
S	Standart sapma
st	Saat
t	Zaman
T	Sıcaklık, °C, K
x	Dönüşüm, %
x_i	Örneğe ait değer
x_{ort}	Örneklere ait ortalama değer
U	Ünite
V_A	Substrat A molar hacmi, cm^3
V_B	Substrat B molar hacmi, cm^3
V_S	Substrat molar hacmi, cm^3
V_E	Ekstraksiyon fazı hacmi, mL
V_R	Reaksiyon fazı hacmi, mL
V_P	Enzim pelletinin hacmi, cm^3
V_T	Reaksiyon toplam hacmi, mL
Y	Verim, %

BF_4^-	Bor tetraflorür iyonu
$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Etanol
$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	Laktik asit
$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3$	Etil laktat
$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5$	Laktik asit dimeri
$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_5$	Etil laktat dimeri
$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_7$	Laktik asit trimeri
$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_7$	Etil laktat trimeri
CO_2	Karbon dioksit
H_2O	Su
H_3PO_4	<i>o</i> -Fosforik asit
KOH	Potasyom hidroksit
$\text{K}_{2.5}\text{H}_{0.5}\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$	12-Fosfotungstik asit potasyum tuzu
PF_6^-	Fosfor hekzaflorür iyonu

ϵ_p	Pellet gözenekliliği
--------------	----------------------

μ	Tepkime ortamı viskozitesi, cP
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μmol	Mikromol
τ	Pellet kıvrım faktörü
σ	Daralma oranı
ϕ	Thiele Modülü

Kısaltmalar

a/a	Ağırlık/ağırlık
A336	Aliquat 336
A, B	Substratlar
Ac	Açıl grubu
ACN	Asetonitril
AYME	Ayçiçek yağı metil esterleri
CAS	Kimyasal Kurumlar Servisi
ChCl	Kolin klorür
DES	Derin ötektik çözücü
DA	Dekanoik asit
Dode	1-Dodekanol
E	Enzim
E.A	Enzim-Substrat A kompleksi
E.Ac.A	Enzim-Açıl-Substrat A kompleksi
E.Ac.B	Enzim-Açıl-Substrat B kompleksi
E.B	Enzim-Substrat B kompleksi
EG	Etilen glikol
EL	Etil laktat
EL2	Etil laktat dimeri
EL3	Etil laktat trimeri
EtOH	Etanol
FAME	Yağ asiti metil esterleri
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Fru	Fruktoz
Ga	Galaktoz
Glu	Glukoz
Gly	Gliserol
h/h	Hacim/hacim
HBA	Hidrojen bağ alıcısı
HBD	Hidrojen bağ donörü
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi

IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LA	Laktik asit
LA2	Laktik asit dimeri
LA3	Laktik asit trimeri
Lid	Lidokain
Malt	Maltoz
Ment	DL-Mentol
n/n	Mol/mol
NADES	Doğal derin ötektik çözücü
OA	Oktanoik asit
PA	Palmitik asit
P, Q	Ürünler
Pro	L-Prolin
v/v	Volume/volume
Xyl	Ksiloz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Etil laktatın molekül yapısı	3
Şekil 2.2 Laktik asit esterleşme tepkimesi ile etil laktat üretimi.....	5
Şekil 2.3 Enzimatik tepkimelerde substrat derişimi ile reaksiyon hızı değişimi	18
Şekil 2.4 $A+B \rightleftharpoons P+Q$ tepkimesi için iki substrat inhibisyonlu Ping-Pong Bi-Bi mekanizmasının Cleland gösterimi	19
Şekil 3.1 Tepkime karışımında gerçekleşen reaksiyonlar	25
Şekil 3.2 Ekstraktif reaksiyon sisteminin şematik gösterimi	26
Şekil 4.1 Farklı derin ötektik çözücü ortamlarında elde edilen reaksiyon başlangıç hızları	31
Şekil 4.2 Derin ötektik çözücü ChCl-Gly (1:2) etanolün içeriği ile elektriksel iletkenliğinin değişimi	33
Şekil 4.3 Farklı çalışma ortamlarındaki Novozym 435 enzimi için kalan aktivite değerleri	34
Şekil 4.4 Farklı su içeriklerindeki ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımalarında elde edilen başlangıç reaksiyon hızları	35
Şekil 4.5 ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımalarında farklı etanol derişimlerinde (3, 5 ve 6 M) farklı laktik asit derişimlerine karşılık başlangıç reaksiyon hızları	36
Şekil 4.6 ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımalarında farklı laktik asit derişimlerinde (0.5, 1, 1.5, 2 ve 3 M) farklı etanol derişimlerine karşılık başlangıç reaksiyon hızları	37
Şekil 4.7 ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımalarında farklı laktik asit derişimlerinde (0.5, 1, 1.5, 2 ve 3 M) farklı etanol derişimlerine karşılık 72 saat dönüşüm değerleri	38
Şekil 4.8 ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımalarında farklı laktik asit derişimlerinde (0.5, 1, 1.5, 2 ve 3 M) farklı etanol derişimlerine karşılık 72 saat verim değerleri	38
Şekil 4.9 Farklı enzim derişimlerinde ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımalarında elde edilen başlangıç reaksiyon hızları	41

Şekil 4.10 Farklı enzim derişimlerinde ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımlarında dönüşüm değerlerinin zamanla değişimi.....	41
Şekil 4.11 Farklı enzim derişimlerinde ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımlarında verimin zamanla değişimi	42
Şekil 4.12 Farklı sıcaklıklarda ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında elde edilen başlangıç reaksiyon hızları	43
Şekil 4.13 Farklı sıcaklıklarda ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında dönüşümün zamanla değişimi.....	43
Şekil 4.14 Farklı sıcaklıklarda ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında dönüşümün zamanla değişimi.....	44
Şekil 4.15 Farklı karıştırma hızlarında ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında elde edilen başlangıç reaksiyon hızları	45
Şekil 4.16 Farklı karıştırma hızlarında ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında dönüşümün zamanla değişimi	45
Şekil 4.17 Farklı karıştırma hızlarında ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında verimin zamanla değişimi	46
Şekil 4.18 Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesi	51
Şekil 4.19 Asit ve alkol inhibisyonunu içeren Ping-Pong Bi-Bi mekanizmasının şematik gösterimi	52
Şekil 4.20 Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesinde önerilen kinetik model için laktik asit derişimine (C_A) karşı başlangıç reaksiyon hızları (r) grafiği	53
Şekil 4.21 Etil laktat üretimine ait Arrhenius grafiği	54
Şekil 4.22 Tek faz, ayçiçek yağı metil esteri (AYME) ve hekzanın kullanıldığı çift faz sisteminde laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonu dönüşümün zamanla değişimi	58
Şekil 4.23 Tek faz, ayçiçek yağı metil esteri (AYME) ve hekzanın kullanıldığı çift faz sisteminde laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonu verimin zamanla değişimi	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Etil laktat için fiziksel ve kimyasal özellikler.....	3
Çizelge 2.2 Enzimatik esterleşme tepkimesi ile etil laktat üretiminin kinetik modelleri.....	21
Çizelge 3.1 Esterleşme reaksiyonunda yer alan girdi ve ürünlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri	22
Çizelge 3.2 Hazırlanan hidrofilik DES ve bileşenleri	24
Çizelge 3.3 Hazırlanan hidrofobik DES ve bileşenleri	24
Çizelge 3.4 Esterleşme tepkimesi örneklerinin HPLC analiz koşulları	28
Çizelge 4.1 Derin ötektik çözücü ChCl-Gly (1:2) özellikleri	32
Çizelge 4.2 Gözlenen Thiele Modülü hesaplamasında kullanılacak parametreler ve literatür değerleri	50
Çizelge 4.3 Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesi kinetik modeli için MATLAB Eğri Uyum Aracı ile belirlenen katsayı değerleri.....	53
Çizelge 4.4 Hidrofilik fazdan hidrofobik ekstraksiyon fazına geçen laktik asit ve etil laktat yüzde değerleri	56

1. GİRİŞ

Etil laktat (EL), toksik, korozif, kanserojenik ve teratojenik olmayan, biyobozunur bir yeşil çözücüdür. Biyokütleden fermentasyon ile elde edilen ve yenilenebilir bir kaynak olan laktik asit, etil laktat üretiminde substrat olarak kullanılmaktadır. Laktik asitin alkol ile esterleşme tepkimesiyle elde edilen esterleri çevreci çözücü olarak kullanılmaktadır. Laktik asit etil esteri olarak bilinen etil laktat bu çözücülerin başında gelmektedir (Vu vd. 2005, Pereira vd. 2011). Yüksek çözme gücü, yüksek kaynama noktası ve düşük buhar basıncı gibi özellikleri nedeniyle etil laktatın en yaygın kullanımı çözücü olarak kullanımınıdır. Başta farmasötik endüstrisi olmak üzere çeşitli alanlarda kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Ayrıca Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından gıdalarda kullanımı onaylanmış olan bir gıda katkı maddesidir. Etil laktat doğal olarak bazı meyvelerin içinde olduğu çeşitli gıdalarda az miktarda bulunmaktadır (Villanueva-Bermejo vd. 2017, Kamalanathan vd. 2018).

Etil laktat endüstriyel olarak etil alkol ile laktik asitin kimyasal esterleşme reaksiyonu ile üretilmektedir. Ancak bu proseste karşılaşılan problem dönüşümün termodinamik denge ile sınırlı olmasıdır. Dönüşümün artırılması için kuvvetli bir asidik katalizör, denge dönüşümünün artırılması için aşırı alkol kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra tepkimedeki dönüşüm ve verimi artırmak ve daha yüksek saflıkta ürün elde etmek amacıyla hibrit proseslerin kullanımı giderek artmaktadır. Etil laktat sentezinde kullanılan hibrit prosesler arasında membran reaktörler, reaktif distilasyon üniteleri ve ekstraktif reaktör sistemleri sayılabilir (Pereira vd. 2011). Bu hibrit proseslerde, sülfürik asit gibi homojen katalizörler ya da asidik iyon değiştirici reçineler gibi heterojen katalizörler kullanılmaktadır.

Hibrit proseslerden biri olan ekstraktif reaksiyon ile istenilen ürün veriminde ve seçimliliğinde artış sağlanmakta ve yan ürünlerin tepkime ortamından ayrılması kolaylaşmaktadır. Ekstraktif reaktörlerde reaksiyon, ekstraksiyon işlemi ile eşanlı olarak gerçekleşmektedir. Reaksiyon ortamı ile karışmayan ikinci bir faz ile ekstraksiyon yapılmaktadır (Samant ve Ng 1998). Çeşitli çalışmalarda ikinci faz olarak *n*-bütil asetat (Mukarami ve Hirata 1997) ve diklorometan (Kachasakul vd. 2003) gibi organik

Çözücüler kullanılmıştır. Bunların yanı sıra biyoçözücü olarak adlandırılan metil oktanoat (Krause vd. 2010) ve kanola yağı metil esteri (Vu vd. 2013) gibi yağ asidi metil esterleri (FAME) de denenmiştir.

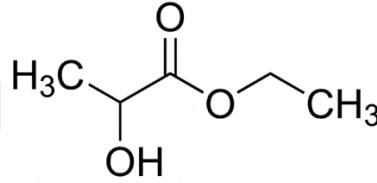
Literatürde enzimatik etil laktat üretimine yönelik çalışmalar da yer almaktadır. Bu amaçla *Candida antartica* kaynağından elde edilen lipaz enzimi tercih edilmektedir. Enzimatik sentez yönteminde de dönüşüm ve verimin artırılması amacıyla biyokatalitik proseslere uygun şekilde hibrit prosesler üzerinde çalışılmaktadır.

Bu yüksek lisans çalışmasının amacı, ticari bir lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde laktik asitin esterleşme reaksiyonuyla etil laktat üretiminin yeşil çözücü sınıfında olan derin ötektik çözücü varlığında incelenmesi ve yine yeşil çözücüler ile gerçekleştirilecek ekstraktif reaksiyon sistemi ile laktik asit dönüşümünün artırılmasıdır. Çalışmada biyokatalizör olarak *Candida antartica* lipaz B enzimi (Novozym 435) kullanılmıştır. Enzimatik etil laktat sentezinde hidrofilik özellikteki farklı derin ötektik çözücülerin kullanımı ve ekstraktif reaksiyon ortamında hidrofobik özellikteki yeşil çözücülerin kullanımı çalışmanın özgün değeridir. Literatürde bu tepkime ortamı için derin ötektik çözücü kullanımı ve ekstraktif reaksiyon sisteminde yeşil çözücü kullanımına yönelik bir çalışma yer almamaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Etil Laktat

Organik esterler kimya endüstrisinin esans, tatlandırıcı, plastikleştirici, çözücü ve ara ürün olarak çok çeşitli alanlarında uygulaması olan önemli bir kimyasal sınıftır ve bu sınıfın en önemli üyelerinden biri etil laktattır. Laktik asit esterleri, süperkritik akışkanlar ve iyonik sıvıların yanı sıra son zamanlarda yeşil çözücü olarak fazlaca dikkat çekmektedir (Aparicio vd. 2009b). Kapalı formülü $C_5H_{10}O_3$ olan ve açık formülü şekil 2.1’de verilen etil laktat, laktik asit etil esteri olarak da adlandırılan önemli bir monobazik esterdir. -L ve -D formlarında bulunabilen etil laktat yeşil çözücü olarak gelecek vadeden alternatif bir çözücüdür (Pereira vd. 2011, Kamalathan vd. 2018). Etil laktat için kimyasal ve fiziksel özellikler çizelge 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1 Etil laktatın molekül yapısı

Çizelge 2.1 Etil laktat için fiziksel ve kimyasal özellikler

Özellik	Etil Laktat
IUPAC Adlandırması	Etil (L)-2-hidroksipropanoat
CAS No	97-64-3
Molekül Ağırlığı	118.13
Molekül Formülü	$C_5H_{10}O_3$
Renk/Görünüş	Renksiz sıvı
Erime Noktası (°C)	-25
Kaynama Noktası (°C)	154
Yoğunluk (g/ml)	1.0328 (20°C)
Çözünürlük	Alkol, Keton, Ester, Hidrokarbonlar, Su

Etil laktat fermentasyon ile üretilen laktik asit ile etil alkolün esterleşme reaksiyonu ile elde edilebilmektedir. Hem hidrofilik hem de hidrofobik çözücüler ile karışabilen etil

laktat, sahip olduğu organik karakteri ile geleneksel organik çözücülerin yerini kolayca alabilecek bir bileşendir. Petrol temelli çözücülere kıyasla çevreci, polar, protik bir biyoçözücüdür (Aparicio vd. 2009a, D'Archivio vd. 2018). Birçok reçineyi çözebilen yeşil çözücü olarak kullanımının yanı sıra etil laktat, gıda endüstrisinde gıda katkısı ve tatlandırıcı olarak, parfümeride koku verici olarak kullanılmaktadır (Pereira vd. 2011).

Tüm bu özelliklerin yanında etil laktat *Yeşil Kimya*'nın 12 prensibinden en az 8 tanesini karşılamaktadır (Pereira vd. 2011). Bu özellikler:

- 1) Etil laktat yenilenebilir ham maddeler ile elde edilebilir ve petrokimyasal çözücülere daha çevreci bir alternatif olabilir (7. Prensiptir).
- 2) Etil laktat % 100 biyobozunur, geri kazanımı kolay, korozif ve kanserojen olmayan bir çözücüdür. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) gıda ürünlerinde kullanımını onayladığı bir kimyasaldır (3., 4. ve 10. Prensiptir).
- 3) Etil laktat reaktiflerin aşırı kullanımına, homojen ve korozif katalizör kullanımına gerek kalmadan heterojen katalizörler ile üretilebilmektedir (1. ve 9. Prensiptir).
- 4) Etil laktat reaksiyonun gerçekleştiği ve en az bir ürünün ayrıldığı, daha az enerjiye ihtiyaç duyan hibrit teknolojiler kullanılarak üretilebilir (5. ve 6. Prensiptir)

Etil laktat birçok sektörde farklı amaçlarla kullanılan bir bileşendir. Tahta, polistiren ve metalleri kaplama amacı ile kullanılırken aynı zamanda çok etkili bir boya soyucu ve grafiti temizleyicidir. Etil laktat, poliüretanı yüksek çözebilmek gücü sayesinde poliüretan endüstrisinde temizleme ajanı olarak kullanılmaktadır. Katı yakıtların, yağların ve gres yağının metal yüzeylerden temizlenmesinde de etkilidir (Pereira vd. 2011). Manyetik bant kaplamada toluen, metil izobütil keton ve metil etil keton gibi hava kirlenmelerinin de yerini almıştır (Nikles vd. 2001). Son zamanlarda ise kirlenmiş topraklardan bakırın uzaklaştırılmasında etkin rol oynadığı belirlenmiştir (Zhan vd. 2012).

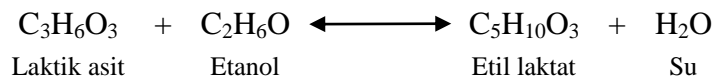
Farmasötik endüstri çözücü kullanımının çok olduğu alandır. Bu sektörde kullanılan kimyasalların % 80'i çözücüdür ve üretimlerde toksik ve zararlı olmayan yeşil

çözücülerin kullanılması önemlidir (Pereira vd. 2011). Etil laktat farmasötik endüstrisinde çeşitli biyoaktif bileşenler için aktif içeriğe zarar vermeyen çözücü/dağıtıcı yardımcı madde olarak kullanılmaktadır. Diğer ilaç katkılarında çözünmesi zor olan birçok aktif bileşen etil laktat içerisinde çözünmektedir (McConville vd. 2009). Farmasötik endüstrisinde etil laktatın kullanımı üzerine bir patentte de etil laktatın aktif bileşenlerin aktifliğine zarar vermeden çözücü/dağıtıcı madde olarak kullanılan etkili bir ajan olduğu gösterilmiştir (Muse ve Colvin 2011).

Etil laktat, aril aldimin ve “synparvolide B” gibi bileşenlerin üretim reaksiyonlarının daha yeşil ortamlarda gerçekleşmesini sağlar. Karotenoid ekstraksiyonunda, kurutulmuş domatesten *-cis* ve *-trans* likopen izomerlerinin ekstraksiyonunda etkili bir çözücü olarak kullanılmaktadır (Pereira vd. 2011). Son yıllarda *Arthrospira platensis*'den γ -linolenik asit ekstraksiyonu (Golmakani vd. 2012), yeşil çaydan kafein ve kateşinlerin ekstraksiyonu (Bermejo vd. 2015) ile zerdeçal bitkisinden gıda ve tekstil endüstrisinde renk verici olarak kullanılan bazı bileşenlerin ekstraksiyonunda (D'Archivio vd. 2018) etil laktat çözücü olarak kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

2.2 Etil Laktat Üretim Prosesleri

Etil laktat endüstriyel olarak sülfürik asit gibi kuvvetli bir asit katalizörlüğünde etil alkol ile laktik asitin şekil 2.2 'de verilen tersinir tepkimesi ile üretilmektedir.



Şekil 2.2 Laktik asit esterleşme tepkimesi ile etil laktat üretimi

Laktik asitin esterleşme reaksiyonu bir denge reaksiyonudur. Dönüşümü arttırmak için sülfürik asit gibi kuvvetli bir asidik katalizör kullanılırken dengeyi aşmak için aşırı alkol kullanılmaktadır (Pereira vd. 2011). Laktik asit esterleşme reaksiyonu ile etil laktat üretimi üzerine alınmış patentler bulunmaktadır.

Arkema (Fransa) etil laktat üretiminde iki patentin sahibidir. US20060041165 A1 numaralı patentte sülfürik asit katalizör olarak kullanılmaktadır. 80°C'de gerçekleştirilen reaksiyonda başlangıç alkol/asit mol oranı 2.5'dir. Reaksiyonda % 70 dönüşüme ulaşıldığında reaktörden etil laktat, etil alkol, su ve laktik asit içeren karışım alınmakta ve bir flaş distilasyon ünitesine beslenmektedir. Üst ürün olarak % 44 etil alkol, % 42 etil laktat ve % 14 su içeren karışım elde edilmektedir. Bu karışım kısmi damıtma kolonuna beslenmekte ve alt üründe % 94.6'dan yüksek saflıkta etil laktat elde edilmektedir (Tretjak vd. 2003). Arkema'nın ikinci patentinde de (US7297809 B2) reaksiyon ortamından azeotrop su/etil alkol karışımı sürekli olarak bir distilasyon kolonuna gönderilmektedir. Bu karışım moleküler elek kullanılarak dehidrasyon işlemine tabi tutulmakta ve etil alkol reaksiyon ortamına tekrar beslenmektedir. Reaksiyon ortamından girdi ve ürünleri içeren karışım da sürekli olarak alınarak damıtılmaktadır. Kolon üstünden su/etil alkol karışımı alınırken etil laktat da bu birimde % 97'den yüksek saflıkta elde edilmektedir (Martino-Gauchi ve Teissier 2007).

Argonne National Laboratuvarı (Amerika Birleşik Devletleri), etil laktatın bir membran ünitesi de içeren proses ile üretimi üzerine US5723639 A numaralı bir patentin sahibidir. Bu patentte diğer iki patentten farklı olarak iyon değiştirici reçine (Amberlyst XN-1010) heterojen katalizör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca oluşan suyun uzaklaştırılması amacıyla pervaporasyon membranı olarak GFT PerVap 1005 kullanılmıştır. Ağırlıkça % 10 laktik asit içeren reaksiyon ortamında gerçekleştirilen tepkimede % 99 laktik asit dönüşümüne ulaşılmıştır. Tepkime sıcaklığı 95 °C ve pervaporasyon vakum basıncı 0.5 mbar değerinin altındadır. Reaksiyon 81.7 saat sonunda tamamlanmıştır ve son reaksiyon karışımı ağırlıkça % 76.3 etil laktat, % 23.2 etil alkol ve % 0.5 laktik asit içermektedir. Su miktarı ise ölçüm değerinin altında kalmıştır. Etil laktat ikinci bir membran ünitesi ya da bir distilasyon kolonu ile saflaştırılmaktadır (Datta ve Tsai 1998).

Patentlerin yanı sıra süreli yayın literatüründe etil laktat üretimi üzerine çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmalarda etil laktat üretiminde genellikle heterojen katalizörler kullanılmaktadır (Zhang vd. 2004, Asthana vd. 2006, Delgado vd. 2007, Pereira vd. 2008).

Zhang vd. (2004) etil laktat üretimi için 5 farklı katalizör varlığında etil alkol ile laktik asitin esterleşme reaksiyonunu incelemişlerdir. Çalışmada reaksiyon kinetiği üzerine katalizör türü (002, Amberlyst 15, D001, D002 ve NKC), katalizör miktarı (% 2, 4 ve 6) ve sıcaklık (60-88 °C) parametrelerinin etkileri araştırılmıştır. En yüksek dönüşümü veren katalizör 002 olarak bulunmuştur. Tüm sıcaklıklarda aynı denge dönüşümüne ulaşıldığı ve sıcaklık arttıkça reaksiyon hızının arttığı görülmüştür. Katalizör miktarı % 4 ile % 6 arasında değişirken dönüşüm önemli oranda değişmediği için optimum değer % 4 olarak kabul edilmiştir. Başlangıç alkol/asit mol oranı 3:1, katalizör miktarı % 4, katalizör 002 ve sıcaklık 88 °C koşullarında gerçekleştirilen reaksiyonda 3 saat içinde yaklaşık % 25 dönüşüme ulaşılmıştır.

Diğer bir çalışmada laktik asit ve oligomerlerinin etil alkol ile esterleşme reaksiyonları Amberlyst 15 katalizörlüğünde incelenmiştir (Asthana vd. 2006). Laktik asit ve oligomerlerinin reaksiyonları için kinetik model araştırılmış ve laktik asitin % 20, 50 ve 88 sulu çözeltilerinin esterleşme reaksiyonları için model tahminlerinin geniş bir aralıkta deneysel sonuçlarla uyumlu olduğu bulunmuştur. Çalışmada, başlangıç alkol/asit mol oranı (1:1-4:1), katalizör miktarı (% 0-5) ve reaksiyon sıcaklığı (62-90 °C) parametreleri incelenmiştir. Karıştırma hızının 740 rpm olduğu çalışmada optimum koşullar başlangıç alkol/asit mol oranı, katalizör miktarı ve reaksiyon sıcaklığı için sırasıyla 3:1, % 3 ve 80 °C olarak bulunmuştur. Optimum koşullar altında yaklaşık % 80 dönüşüme ulaşılmıştır.

Delgado vd. (2007) Amberlyst 15 katalizörlüğünde etil laktat üretiminin yanı sıra etil laktatın hidrolizini de incelemişlerdir. Laktik asitin etil alkol ile esterleşme reaksiyonuna karıştırma hızının (100-235 rpm), katalizör miktarının (% 1.1-6), alkol/asit mol oranının (0.5-6) ve sıcaklığın (55-85.5 °C) ve etil laktatın hidrolizi tepkimesine ise su/etil laktat mol oranının (1-15) ve sıcaklığın (55-87 °C) etkisinin incelendiği deneyler yapılmıştır. Karıştırma hızı için dış kütle aktarım direncinin ihmal edilebildiği 185 rpm en uygun değer olarak bulunmuştur. Katalizör miktarı ve sıcaklık arttıkça esterleşme ve hidroliz için reaksiyon hızları artmış, dönüşüm değişmemiştir. Optimum koşullarda çalışılarak esterleşme ve hidroliz için maksimum dönüşüm sırasıyla % 35 ve % 85 olarak bulunmuştur.

Reaktif distilasyon, tersinir reaksiyonların bulunduğu birçok proste kullanılmaktadır. Distilasyon kolonunun katalitik bölgesine sabitlenmiş katı asidik katalizörlerin kullanılması homojen prosesleri aksine çevreye daha dost bir proses haline getirmiştir (Gao vd. 2007). Buna karşın reaktif distilasyon prosesi yüksek enerji kullanımını gerektirmektedir. Reaktif distilasyon kolonunda etil laktat üretiminin gerçekleştirildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır.

Asthana vd. (2005), etil alkol ile laktik asit çözeltisinin Amberlyst 15 varlığında esterleşme reaksiyonu ile sürekli sistemde etil laktat üretimini reaktif ayırma kolonunda gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada alkol/asit besleme oranı, etil alkolün besleme sıcaklığı ve geri akma oranı gibi parametreler incelenmiş ve en uygun değerler sırasıyla 3, 85 °C ve 0 olarak bulunmuştur. Optimum değerlerde yapılan deneylerde laktik asit dönüşümü % 85 iken etil laktat verimi % 66 olarak hesaplanmıştır.

Diğer bir reaktif distilasyon kolonunda yapılan etil laktat üretim çalışmasında $SO_4^{2-}/ZrO_2-Fe_3O_4$ katalizör olarak kullanılmıştır (Gao vd. 2007). Geri akma oranı, alkol/asit mol oranı, laktik asit besleme hızı ve beslemenin yeri gibi parametreler ile kullanılan sistemin etil laktat üretimi için uygun olup olmadığı araştırılmıştır. Yapılan deneyler ile geri akma oranı, alkol/asit mol oranı ve laktik asit besleme hızı için en uygun değerler sırasıyla 1, 4:1 ve 0.6384 mol/st olarak bulunmuştur. Etil alkol kolonun en altından ve laktik asit ise kolonun en üstünden beslendiğinde en yüksek verim elde edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen etil laktat verimi ise % 51.64 olarak hesaplanmıştır.

Farklı bir çalışmada ise reaktif distilasyon ünitesinde etil alkol ve laktik asitin esterleşme reaksiyonu ile sülfürik asit katalizörlüğünde incelenmiştir (Komesu vd. 2015). Deneylerde alkol/asit mol oranı, kazan sıcaklığı ve katalizör derişiminin etil laktat verimine etkileri incelenmiştir. En yüksek etil laktat verimi etil alkol/laktik asit mol oranı 50, kazan sıcaklığı 100 °C ve katalizör derişimi % 10 (a/a) iken % 87.61 olarak hesaplanmıştır.

Pervaporasyon reaktörler katalizör varlığında gerçekleşen esterleşme reaksiyonlarında en çok kullanılan reaktör sistemleridir. Pervaporasyon, uçucu bileşenlerin ayrılması ve

organik kimyasalların dehidrasyonu için yüksek seçicilikte ayırma ve enerji verimi sağlamaktadır. Bunun yanı sıra verimlilik ve dönüşüm önemli oranda artmaktadır (Wasewar vd. 2009). Membran temelli pervaporasyon prosesleri ekstra ayırma ünitesi de gerektirmezler. Ancak bu proseslerde etil laktat üretiminde verimlilik düşüktür. Asidik koşullarda membranların kullanım süresi veya kararlılığı sorun olabilir ve ek olarak vakum maliyeti de vardır (Pereira vd. 2011). Literatürde membran reaktörler ile etil laktat üretimi incelenmiştir:

Tanaka vd. (2002), Amberlyst 15 katalizörlüğünde gerçekleştirilen etil laktat üretiminde Zeolit T membran ile ayırma işlemini de uygulamışlardır. Bu membran reaktörde reaksiyon karışımından suyun uzaklaştırılması ile kısa sürede yaklaşık % 100 dönüşüme ulaşılmıştır. Başlangıç alkol/asit mol oranı 2.4 ve 3.6 iken membran içeren ve membran içermeyen reaktörde 4 farklı deney yapılmıştır. Membran içermeyen reaksiyonlarda denge dönüşümüne 22 saat sonunda ulaşılırken Zeolit T membran içeren sistemlerde denge dönüşümüne 8 saat sonunda ulaşılmıştır. En yüksek dönüşüme yaklaşık % 100 olarak 87 °C sıcaklıkta ulaşılmıştır.

Wasewar vd. (2009), pervaporasyon teknolojisini kullanarak etil laktat üretimi üzerine çalışmışlardır. Çalışmada başlangıç girdi mol oranı, etkin membran alanının reaksiyon karışımı hacmine oranı, katalizör derişimi ve sıcaklık gibi parametrelerin proses değişkenlerinin üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu parametreler için en uygun değerler sırasıyla 2, 10 m⁻¹, 30 g/L ve 95 °C olarak bulunmuştur. Laktik asit dönüşümünde yaklaşık % 80 değerinin üzerine çıkmıştır.

Pervaporasyon işleminin uygulandığı bir başka çalışmada ise etil laktat üretimi PERVAP 2201 hidrofilik membranı ile reaksiyon ortamından suyun uzaklaştırıldığı sistemde Amberlyst 15 katalizörlüğünde incelenmiştir (Delgado vd. 2010). Çalışmada başlangıç girdi mol oranı, katalizör derişimi, membran alanının başlangıç reaksiyon hacmine oranı ve reaksiyon ile pervaporasyon sıcaklıklarının dönüşüme etkisi araştırılmıştır. Bu parametreler için optimum değerler sırasıyla 2, % 2 (a/a), 23 m⁻¹ ve 75 ile 69 °C olarak bulunmuştur. Optimum koşullarda yaklaşık % 20 dönüşüme ulaşılırken pervaporasyon prosesi ile birlikte yaklaşık % 90 dönüşüme ulaşılmıştır.

Teerachaiyapat ve Ramakul (2016), laktik asitten etil laktat sentezi için sürekli olarak işletilen bir reaktör gibi tasarlanan “hollow fiber” destekli sıvı membran kullanmışlardır. Laktik asit tri-*n*-oktilamin ile kompleks oluşturmakta ve bu kompleks ile etil alkol arasındaki reaksiyon sonucu su ve amin oluşurken etil laktat üretilmektedir. Çalışmada tri-*n*-oktilamin derişimi, etil alkol derişimi ve reaksiyon sıcaklığının optimum değerleri Merkezi Kompozit Tasarımı ile hesaplanmıştır. Deneyler sonucunda tri-*n*-oktilamin derişiminin etil laktat verimini etkilemediği bulunmuştur. Etil alkol derişimi ve reaksiyon sıcaklığı için optimum değerler sırasıyla 5.5 mol/L ve 65 °C olarak bulunmuş ve bu optimum değerlerde yapılan deneylerde etil laktat verimi yaklaşık % 30 olarak hesaplanmıştır.

Kromotografik reaktörler reaksiyonda dönüşüm ve üretimin arttırıldığı, ürünün oluştuktan sonra reaksiyon karışımından eşanlı olarak ayrıldığı sistemlerdir. Kromotografik reaktörlerden olan hareketli ve sabit yatak reaktörleri ile aşırı çözücü kullanımına gerek kalmamaktadır. Bu reaktörler kullanılarak gerçekleştirilen etil laktat üretimi çalışmaları literatürde yer almaktadır:

Pereira vd. (2009a), hareketli yatak reaktörleri ile etil laktat üretimi için yeni bir sistem kullanmışlardır. Hareketli yatak reaktörünün dinamik davranışı için bir matematik model geliştirilmiş ve model ile deneysel sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Besleme bileşimi, reaktör konfigürasyonu, işletme süresi gibi işletme parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Hareketli yatak reaktörün etil laktat üretimi için uygun bir sistem olduğu görülmüştür. Bu proses ile 32 kg_{EL}/(L_{ads}-gün) verimlilik ile % 95 saflıkta etil laktat elde edilmiştir.

Pereira vd. (2009b) bir diğer çalışmalarında, etil laktat üretimi için Amberlyst 15-wet ile doldurulmuş sabit yatak reaktör kullanılmıştır. Hareketli yatak ve sabit yatak reaktörler için geliştirilen matematik modelin deneysel verilere uyumluluğu araştırılmıştır. Sabit yatak sisteminin de etil laktat üretimi için kullanılabilir olduğu görülmüştür. Optimum koşullarda ve pilot ölçekte çalıştırılan sistemde % 100 laktik asit dönüşümü elde edilmiştir.

Laktik asitin etil alkol ile esterleşme tepkimesi etil laktat sentezinde asit kimyasal katalizörleri yanı sıra biyokatalizör olarak lipaz enzimi de kullanılabilir. Enzimatik tepkimeler ile ester oluşumunu etkileyen önemli parametreler arasında substrat ve enzim derişimi, girdi mol oranı, tepkime sıcaklığı ve su içeriği yer almaktadır (Stergiou vd. 2013). Bu durumda girdi ve ürünleri çözebilen ve lipaz enziminin aktif olduğu çözücü kullanımı önemlidir. Enzimatik tepkimelerde çözücü olarak organik çözücülerin yerini son yıllarda alternatif çözücüler olan iyonik sıvılar ve derin ötektik çözücüler almaya başlamıştır. Lipaz biyokatalizörlüğünde gerçekleştirilen etil laktat üretimine yönelik çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

Major vd. (2010), Novozym 435 katalizörlüğünde etil laktatın farklı çözücülerde üretimini ve bu üretimde su içeriğinin etkisini incelemiştir. Deneyler 40 °C ve 150 rpm koşullarda 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Suyun varlığının reaksiyona etkisini incelemek amacıyla ortandan suyun membran sistemi ile uzaklaştırıldığı deneyler yapılmıştır. İyonik sıvı ve iki organik çözücü (hekzan ve toluen) reaksiyon ortamı olarak kullanılmıştır. Deneylerde katalitik etki göstermeyen % 95 verime ulaşılan Cyphos 202 çözücü olarak seçilmiştir. Organik çözücülerde girdiler tam olarak çözünmediği için yüksek dönüşüm elde edilememiştir. İyonik sıvı ortamında daha az enzim varlığında daha yüksek dönüşüme ulaşıldığı için iyonik sıvı en uygun ortam olarak bulunmuştur. Ortandan suyun uzaklaştırılması ile etil laktat veriminin düştüğü görülmüştür. Bunun nedeni olarak suyun ortandan uzaklaştırılması ile ester oluşumunun düşmesi ve laktik asitin oligomerleşmesinin artması verilmiştir.

Huang vd. (2009) yaptıkları çalışmada, t-bütanol ortamında farklı biyokatalizörler kullanarak laktik asit esterleşme reaksiyonu ile etil laktat üretimini incelemiştir. Lipolase, PPL, CLL, TL IM ve Novozym 435 biyokatalizörlerinden en iyi sonucu Novozym 435 vermiştir. Laktik asit ve etanol inhibisyonunu azaltmak amacıyla çözücü olarak t-bütanol kullanılmıştır. Asit:alkol mol oranı, sıcaklık, laktik asit başlangıç derişimi, karıştırma hızı, enzim miktarı ve reaksiyon süresi gibi parametrelerin verime etkisini incelenmiştir. Parametreler için elde edilen optimum değerler sırasıyla 1:8, 60 °C, 0.3 mol/L, 200 rpm, 45 g/mol ve 24 saattir. Optimum koşullarda % 77.2 etil laktat verimine ulaşıldığı bildirilmiştir.

Sun vd. (2010), tutuklanmış lipaz katalizörlüğünde ve t-bütanol ortamında etil laktat üretimi ve tepkime kinetiği üzerine çalışmışlardır. t-Bütanol, laktik asiti çok iyi çözebildiği için ve laktik asitin asitliğini bastırması amacıyla kullanılmıştır. Reaksiyon parametreleri olan alkol/asit mol oranı, toplam substrat miktarı, sıcaklık, reaksiyon süresi ve karıştırma hızı optimize edilmiş ve sırasıyla en uygun değerler 8.3, 0.4 g, 55 °C, 26.87 st ve 150 rpm olarak bulunmuştur. Optimum koşullarda etil laktat verimi % 24.32 olarak hesaplanmıştır.

Novozym 435 katalizörlüğünde gerçekleştirilen bir başka çalışmada rasemik laktik asitten L-etil laktat üretimi iyonik sıvı ortamında incelenmiştir (Findrik vd. 2012). Çalışmalarda Cyphos 104 ve Cyphos 201 olmak üzere iki farklı iyonik sıvı kullanılmış ve katalitik özellik göstermeyen Cyphos 104 en uygun ortam olarak seçilmiştir. İyonik sıvı kütlesi/enzim kütlesi (10, 15 ve 20), su içeriği (% 8, 12 ve 16), alkol/asit mol oranı (3, 7 ve 11) ve sıcaklık (30, 50 ve 70 °C) gibi parametreler araştırılmıştır. Sıcaklık ve alkolün aşırısı etil laktatın enantiyomerik aşırılığını etkilerken laktik asit dönüşümünü en çok sıcaklık ve su içeriği etkilemiştir. İyonik sıvı kütlesi/enzim kütlesi reaksiyonda enantiyomerik aşırılığı ve dönüşümü etkilemezken su içeriği, alkol/asit mol oranı ve sıcaklık parametreleri için en uygun değerler sırasıyla % 8, 11 ve 30 °C olarak bulunmuştur. Optimum koşullarda gerçekleştirilen deneylerde en yüksek dönüşüm % 63.8 ve en yüksek enantiyomerik aşırılık % 34.3 hesaplanmıştır.

Literatürde ekstraktif reaksiyon ile ticari lipaz Novozym 435 katalizörlüğünde derin ötektik çözücü ortamında etil laktat üretimine yönelik çalışma bulunmamaktadır.

2.3 Ekstraktif Reaksiyon ile Etil Laktat Üretimi

Ekstraktif reaksiyon, reaksiyon ve ekstraksiyon ile ayırmanın eşanlı olarak gerçekleştiği hibrit bir prosestir. Bu proseste çözücü içeren ikinci bir sıvı faz kullanılmaktadır. Bu faza reaksiyonda oluşan ara ürün, yan ürün ya da hedeflenen ürünün ekstraksiyonu ile dönüşüm ve verimin artırılması amaçlanmaktadır. Ekstraktif reaksiyon sistemleri temelde enzimlerin kullanıldığı biyokimyasal proseslerde kullanılsa da kimyasal proseslerde uygulandığı çalışmalar da yer almaktadır (Kachasakul vd. 2003).

Literatürde laktik asitin etil alkol ile esterleşme tepkimesinde ekstraktif reaksiyon sisteminin uygulandığı bir çalışma yer almaktadır. Vu vd. (2013) sülfürik asit, Amberlyst 15 ve $K_{2.5}H_{0.5}PW_{12}O_{40}$ olmak üzere 3 farklı katalizör varlığında etil laktat sentezini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada ekstraktif faz olarak kanola yağı metil esteri kullanılmıştır. Reaksiyon süresince etil laktat yağ asiti metil esteri fazına ekstrakte edilmiş ve yeni oluşan biyoçözücünün saflaştırılmadan biyodizel olarak kullanılabilceği belirtilmiştir. Alkol/asit mol oranının 3.3, sıcaklığın 80 °C ve katalizör miktarının 1.4 g olduğu koşullarda gerçekleştirilen tek fazlı deneylerde 6 saat sonunda % 60 etil laktat verimine ulaşılırken ekstraktif reaksiyon uygulandığı durumda % 80 verime ulaşılmıştır.

2.4 Yeşil Çözücüler

Çözücüler farmasötik endüstri başta olmak üzere boyama-kaplama, kozmetik, gıda ve otomotiv endüstrisi gibi birçok alanda fazla miktarda kullanılmaktadır. Özellikle farmasötik ürünlerin üretiminde az miktardaki ürün için oldukça fazla çözücü harcanmaktadır. Çözücüler proseslerde kullanılan kimyasal hacminin yaklaşık % 80'ini kapsamaktadır. En çok tercih edilen çözücüler ise ürün ayrılmasının ve çözücünün geri kazanımının daha kolay olması nedeniyle düşük kaynama noktasına sahip organik çözücüler olmaktadır. Ancak bu çözücülerin yanıcı özelliklerinin yanı sıra depolanma zorlukları ve çalışma sırasında maruz kalınan yan etkileri vardır (Capello vd. 2007, Gu ve Jérôme 2013).

Yeşil kimyaya göre proseslerde çözücü kullanılmaması en ideal durumdur. Ancak, çözücüsüz ortamda gerçekleştirilen reaksiyonlarda ölçek büyütüldüğü zaman kütle aktarım kısıtlamaları, reaktiflerin erime noktaları, viskozite ve ekzotermik reaksiyonların kontrolü gibi zorluklar ile karşılaşmaktadır. Bu nedenle günümüzde birçok proseste çözücüler kullanılmaktadır. Özellikle uçucu ve sağlığa oldukça zararlı çözücülerin kullanımından kaynaklanan çevresel etkilerin minimize edilmesi amacıyla yeşil çözücü kavramı ortaya çıkmıştır (Capello vd. 2007, Gu ve Jérôme 2013). Yeşil çözücü için yapılmış kesin tanımlar bulunmamaktadır. Yine de bir çözücünün taşınması beklenen 12 kriter *Yeşil Kimya* prensiplerine göre belirlenmiştir (Gu ve Jérôme 2013).

1. *Ulaşılabilirlik*; bir yeşil çözücü büyük miktarlarda ulaşılabilir olmalı ve üretim kapasitesinde sürekli değişiklik olmamalıdır.
2. *Fiyat*; yeşil çözücüler geleneksel çözücüler ile fiyat anlamında yarışabilmelidir.
3. *Geri dönüştürülebilirlik*; tüm proseslerde yeşil çözücüler ekonomik yollarla tamamen geri kazanılmalıdır.
4. *Yüksek saflık*; saflaştırma işlemindeki enerji tüketiminden kaçınmak için teknik saflıkta çözücüler tercih edilmektedir.
5. *Kolay sentez*; yeşil çözücüler fazla enerjinin harcanmadığı prosesler ile hazırlanabilir olmalıdır.
6. *Düşük toksiklik*; yeşil çözücüler insan sağlığı ve çevre açısından ihmal edilebilecek bir toksisiteye sahip olmalıdır.
7. *Biyobozunurluk*; yeşil çözücüler biyobozunur olmalı ve toksik metabolit üretmemelidir.
8. *Yüksek performans*; yeşil çözücüler kullanılan çözücülere yakın veya bu çözücülerden daha iyi performans göstermelidir.
9. *Kararlılık*; yeşil çözücüler ısıl ve elektrokimyasal kararlılıkta olmalıdır.
10. *Düşük yanıcılık*; güvenli çalışma koşulları için yeşil çözücüler yanıcı olmamalıdır.
11. *Kolay depolanma*; yeşil çözücüler kolay depolanabilmenin yanı sıra güvenli bir şekilde kara, hava ve deniz taşımacılığı ile taşınabilmelidir.
12. *Yenilenebilirlik*; yeşil çözücüler hazırlanırken kullanılan hammaddelerin yenilenebilir olması karbon ayakizi açısından önemlidir.

Tüm bu özellikleri aynı anda sağlayan bir çözücü bulunmamaktadır. Ancak son yıllarda literatürde bu kriterlerin birçoğunu sağlayan yeni çözücüler önerilmektedir (Gu ve Jérôme 2013). Yeşil çözücüler; süperkritik akışkanlar, biyoçözücüler, iyonik sıvılar ve derin ötektik çözücüler olarak sınıflandırılabilir.

2.4.1 Derin ötektik çözücüler

İyonik sıvılar, negatif ve pozitif yüklü iyonlardan oluşmaktadır. Tuzlara benzer yapıda olmalarına rağmen tuzlar 800 °C'den düşük sıcaklıklarda erimezken iyonik sıvılar oda

sıcaklığında sıvı haldedir. İyonik sıvılarda imidazolyum ve piridinyum katyon olarak ve BF_4^- ile PF_6^- anyon olarak kullanılan önemli bileşenlerdir. İyonik sıvılar birçok avantajı ile dikkat çekmiş olsa da organik çözücülere göre hazırlanması daha zor ve daha maliyetlidir. Toksisite, düşük biyobozunurluk ve ayarlanamayan fiziksel özelliklerinden dolayı kullanımında kısıtlamalar olmuştur. Ayrıca çevreye olan etkileri anyon ve katyonlarının yapısına bağlı olarak değişmektedir. İyonik sıvıların olumsuz etkilerinde kaçınmak için derin ötektik çözücü olarak adlandırılan alternatif çözücüler ortaya çıkmıştır (Keskin vd. 2007, Oleveira vd. 2013, Garcia vd. 2015).

Derin ötektik çözücüler (DESSs), iyonik sıvılara benzer fiziksel özellikler göstermesi nedeniyle iyonik sıvıların yeni bir sınıfı olarak bilinmektedir. Benzer özellikte olsalar da derin ötektik çözücülerin üretimi iyonik sıvılara göre daha kolaydır ve derin ötektik çözücülerin hammadde maliyeti daha düşüktür. Derin ötektik çözücüler, ötektik karışım oluşturabilecek hidrojen bağ alıcı ve hidrojen bağ donörünün doğru mol oranlarında karıştırılması ile elde edilmektedir. Derin ötektik çözücü kendini oluşturan bileşenlerden daha düşük sıcaklıkta erime noktasına sahiptir (Leron ve Li 2012, Zhang vd. 2012, Smith vd. 2014).

Derin ötektik çözücüler çoğunlukla kuarterner amonyum tuzları ile metal iyonları veya amonyum tuzları ile kompleks oluşturabilecek hidrojen bağ donörleri karıştırılarak elde edilir. Sentetik bileşenler ile oluşmasının yanı sıra organik asit ve şeker gibi doğal bileşenler ile de oluşturulmaktadır. Bu çözücülere de doğal derin ötektik çözücü denilmektedir. İyonik sıvılar ile benzer çözücü özelliklerine sahiptirler. Ancak daha ucuz hammaddelerden üretilmeleri, daha düşük toksisiteye sahip olmaları ve biyobozunur olmaları iyonik sıvılara göre üstünlükleridir. Literatür çalışmalarında en çok kullanılan derin ötektik çözücü bileşenlerinden biri kolin klorürdür (ChCl). Kolin klorürün çok tercih edilen bileşen olmasının nedeni oldukça ucuz ve biyobozunur olması, toksik olmaması, biyokütle veya fosil rezervlerinden kolayca elde edilebilmesidir. Kolin klorür ile hazırlanan derin ötektik çözücülerde hidrojen bağ donörü olarak üre, sitrik asit ve amino asit gibi yenilenebilir karboksilik asitler veya gliserol gibi yenilenebilir polioller ve karbonhidratlar kullanılmaktadır (Zhang vd. 2012, Paiva vd. 2014).

Kolin klorür temelli derin ötektik çözücülerin ilk kez çalışıldığı 2004 yılından bu yana derin ötektik çözücüler üzerine önemli sayıda literatür çalışması yer almaktadır. Bu çalışmalar özellikle ötektik çözücülerin fizikokimyasal ve termodinamik özelliklerinin incelenmesi üzerinedir. Bu çözücülerin farklı alanlarda kullanımları araştırılmaktadır. Hücrelerin yaşama yetenekleri, 25mg/mL derişimde çözeltileri hazırlanan doğal derin ötektik çözücüler (NADES) ve iyonik sıvılarda incelenmiş ve doğal derin ötektik çözücülerin hücreler için daha uygun ve daha az toksik ortam olduğu bildirilmiştir (Paiva vd. 2014).

Derin ötektik çözücülerin biyokimyasal proseslerde kullanımı da araştırılmaktadır. Kolin klorür temelli derin ötektik çözücülerde *Candida antartica* lipaz B enziminin yüksek aktivite ve kararlılık gösterdiği bulunmuştur (Gorke vd. 2010). Bir başka çalışmada *p*-nitrofenil palmitatın hidroliz reaksiyonunda *Burkholderia cepacia* lipazının derin ötektik çözücü ortamında daha aktif olduğu görülmüştür (Juneidi vd. 2017). Bu yeşil çözücü ortamında kahve çekirdeği, zeytin yaprağı ve ayçiçek yaprağından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu diğer bir çalışma alanıdır. Biyomedikal uygulamalarda ve CO₂'in tutulması ile depolanması gibi önemli alanlarda kullanımı araştırılmaktadır (Paiva vd. 2014).

Derin ötektik çözücülerini oluşturan bileşenler arasında güçlü bir bağ oluşmaktadır. Bu nedenle derin ötektik çözücülerin reaktifliği azalarak çoğu durumda inert bileşen gibi davranmaktadır. Biyokatalitik çalışmalarda derin ötektik çözücü yapısına benzeyen substratlar kullanılması ile substrat ile derin ötektik çözücü arasında bir başka güçlü bir hidrojen bağı oluşmaktadır. Bu da substratın reaktifliğinin azalmasına sebep olmaktadır (Durand vd. 2013).

Birçok çalışmada kullanılan derin ötektik çözücüler su ile karışabilen hidrofilik çözücülerdir. Ancak son birkaç yılda yapılan çalışmalarda özellikle S₁V₁-S₁V₁ ekstraksiyon proseslerinde önemli avantaj sağlayacak hidrofobik özellikte derin ötektik çözücüler de hazırlanmıştır. Hidrofobik özellik genellikle dekanolik asit ve DL-mentol gibi suda çözünürlüğü oldukça düşük olan bileşenler kullanılarak sağlanmıştır. S₁V₁-S₁V₁

ekstraksiyonda hidrofobik derin ötektik çözücüler ile alkali ve geçiş metal iyonları içeren sulu çözeltiler arıtılabilmektedir (van Osch vd. 2015).

Hidrofilik derin ötektik çözücüler ile yapılan CO₂ tutulması ve depolanması çalışmalarında iyonik sıvılara göre istenilen başarı elde edilmemiştir. 2015 yılında sulu çözeltilerden metal iyonlarının, biyomoleküllerin ve yağ asitlerinin uzaklaştırılmasında başarıyla kullanılan hidrofobik derin ötektik çözücüler keşfedilmiş ve CO₂ depolama çalışmalarında da kullanılmıştır. Hidrofobik derin ötektik çözücüler ile hidrofilik çözücülerden daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Dietz vd. 2017).

2.4.2 Biyoçözücüler

Biyokütle türevli çözücüler (biyoçözücüler) sürdürülebilir kimya ve yeşil kimya için çevre dostu ve gelecek vadeden çözücülerdir. Yenilenebilir kaynaklardan üretimi, düşük toksisite, düşük uçuculuk ve ayarlanabilir fizikokimyasal özelliklere sahip olmaları ile dikkat çekmektedir. Biyoçözücülerin önemli sınıfları, karbonhidratlardan fermentasyon ile üretilen organik asitlerin esterleri, yağ asiti esterleri, biyoetanol ve gliserol türevleridir (Bayón vd. 2013, Vu vd. 2013).

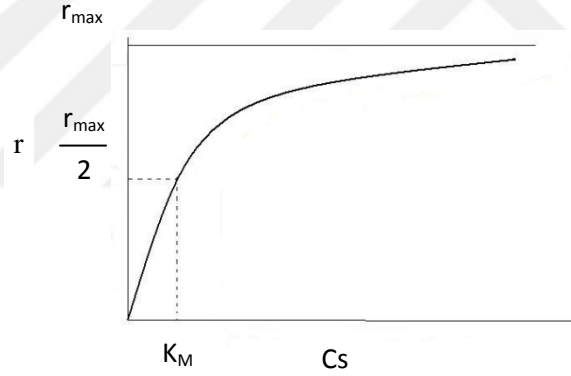
Literatür çalışmalarında biyoçözücülerin reaksiyon performansını seçicilik, katalizör aktivitesi, kararlılık ve yeniden kullanılabilirlik açısından arttırdığı görülmüştür (Hernaiz vd. 2010). Şimdiye kadar gliserol, etil laktat, D-limonen ve metil soyat gibi birkaç biyoçözücü ticarileştirilmiştir. Gliserol yeşil çözücü olarak bilinmesine rağmen çözücü ve katalizör olarak kullanımı yüksek viskozitesi nedeniyle kısıtlıdır. Yüksek viskozitesi, kolin klorür ile derin ötektik çözücü hazırlayarak azaltılmıştır (Gu ve Jérôme 2013).

Yağ asiti metil esterleri petrol temelli çözücülere alternatif, çevreye dost olarak bilinen biyoçözücülerdir. Metil oleatın polimerizasyon reaksiyonlarında çözücü olarak kullanılması ile yağ asiti metil esterlerinin endüstriyel kullanımı başlamıştır. Ancak organik çözücülere kıyasla yüksek maliyette üretimi nedeniyle uygulanması sınırlanmıştır. Günümüzde bitkisel yağların alkol ile transesterleşme reaksiyonlarıyla

çok miktarda üretilebilmesi maliyeti düşürmüştür (Wilders 2002). Ancak petrol temelli çözücüler ile benzer özelliklere sahip olsa bile biyoçözücülerin tüketim ihtiyacını karşılayacak miktarda üretiminin zaman alacağı bildirilmiştir (Gu ve Jérôme 2013).

2.5 Enzimatik Etil Laktat Üretim Kinetiği

Tek substratlı enzimatik tepkimelerde hız, Michaelis-Menten kinetiği ile ifade edilir. Düşük substrat derişimlerinde reaksiyon hızı birinci mertebededir. Ancak derişimin artması ile reaksiyon hızının mertebesi azalmakta ve yüksek derişimlerde mertebe sıfıra yaklaşmaktadır. Yüksek substrat derişimlerinde hız maksimum değerine ulaşmaktadır (Şekil 2.3). Substrat derişimindeki değişim ile reaksiyon hızının bu değişimi ilk olarak 1913 yılında Michaelis ve Menten tarafından ortaya konmuştur. Eşitlik 2.1’de enzim katalizli tepkime mekanizması önerilmiştir (Shaw 1957).



Şekil 2.3 Enzimatik tepkimelerde substrat derişimi ile reaksiyon hızı değişimi



Eşitlik 2.1’deki tepkime mekanizması için Eşitlik 2.2’de verilen reaksiyon hız denklemini geçerlidir (Shaw 1957).

$$r = \frac{r_{max}C_s}{K_m + C_s} \quad (2.2)$$

Burada:

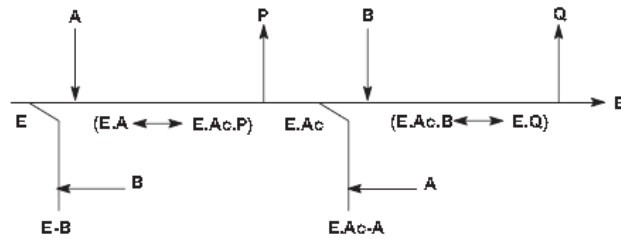
- r substratın harcanma hızı, mol/Lst
- C_s substrat derişimi, mol/L
- K_m Michaelis-Menten sabiti, mol/L
- r_{max} Verilen enzim derişimindeki maksimum reaksiyon hızı, mol/Lst

dır.

Lineweaver ve Burk (1934) tarafından Eşitlik 2.2'deki denklem ters çevrilerek doğrusallaştırılmıştır. Elde edilen denklem Eşitlik 2.3'de yer almaktadır. Bu denklem için $1/r$ 'e karşı $1/C_s$ grafiği çizilirse eğim ve kayma sırasıyla K_m/r_{max} ve $1/r_{max}$ değerlerini verir (Shaw 1957).

$$\frac{1}{r} = \frac{K_m}{r_{max}C_s} + \frac{1}{r_{max}} \quad (2.3)$$

Michaelis ve Menten tarafından önerilen bu model tek substratlı enzim katalizli tepkimeler içindir. İki substrat ile gerçekleşen tepkimeler için kullanılan hız modeli ise şekil 2.4'de mekanizması verilen Ping-Pong Bi-Bi modelidir. Esterleşme tepkimeleri de iki substrat ile gerçekleştiği için hız modeli olarak Ping-Pong Bi-Bi modeli uygulanmaktadır. İnhibisyonsuz Ping-Pong Bi-Bi kinetik modelinde hız, Eşitlik 2.4'de verilen denklem ile ifade edilmektedir. Ping-Pong Bi-Bi kinetik modeli genellikle substrat inhibisyonunu da içermektedir. Tek substrat inhibisyonu içeren tepkimeler için reaksiyon hızı Eşitlik 2.5'de verilmiştir (Sun vd. 2010).



Şekil 2.4 $A+B \rightleftharpoons P+Q$ tepkimesi için iki substrat inhibisyonlu Ping-Pong Bi-Bi mekanizmasının Cleland gösterimi

(A, B substratlar, P, Q ürünler, E enzim, Ac açil grubu)

$$r = \frac{r_{max}C_A C_B}{C_A C_B + K_A C_B + K_B C_A} \quad (2.4)$$

$$r = \frac{r_{max}C_A C_B}{C_A C_B + K_A C_B \left[1 + \frac{C_B}{K_{iB}}\right] + K_B C_A} \quad (2.5)$$

Etanolün lipaz enzim üzerine inhibisyon etkisinin olduğu bilinmektedir. Ancak etil laktat üretimindeki ikinci substrat olan laktik asit de yüksek polaritesi ve asitliği nedeniyle enzimi deaktive edebilmektedir. Bu nedenle iki substrat inhibisyonlu reaksiyon hızı modeli oluşturulmuştur ve bu model Eşitlik 2.6'de yer almaktadır (Sun vd. 2010).

$$r = \frac{r_{max}C_A C_B}{C_A C_B + K_A C_B \left[1 + \frac{C_B}{K_{iB}}\right] + K_B C_A \left[1 + \frac{C_A}{K_{iA}}\right]} \quad (2.6)$$

Burada:

r	substratın harcanma hızı, mol/Lst
C_A, C_B	substrat derişimleri, mol/L
K_A, K_B	Michaelis-Menten sabitleri, mol/L
K_{iA}, K_{iB}	İnhibisyon sabitleri, mol/L
r_{max}	Verilen enzim derişimindeki maksimum reaksiyon hızı, mol/Lst

dır.

Etil laktatın lipaz katalizli üretim reaksiyonunda hız modelinin incelendiği üç farklı çalışma çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Zhao vd. (2008) yaptıkları çalışmada, laktik asitin etanol ile enzimatik esterleşme tepkimesinin laktik asit ve etanol inhibisyonlu Ping-Pong Bi-Bi kinetik modeline uygun olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada kütle aktarım kısıtlaması olmadığı bulunmuştur. Laktik asit ve etanol için inhibisyon sabitleri sırasıyla 10.7 ve 275 mmol/L'dir. Araştırmacılara göre laktik asit, enzim çevresinde sulu bir mikro tabaka oluşturmakta ve

pH düşüşüne neden olmaktadır. Bu nedenle laktik asitin enzim inhibisyonunda etanole göre daha çok etkili olduğu önerilmiştir.

Çizelge 2.2 Enzimatik esterleşme tepkimesi ile etil laktat üretiminin kinetik modelleri

Substratlar	Enzim	Kinetik model	Kaynak
Laktik asit (A) Etanol (B)	Lipaz	$r = \frac{r_{max}C_A C_B}{C_A C_B + K_A C_B \left[1 + \frac{C_B}{K_{iB}}\right] + K_B C_A \left[1 + \frac{C_A}{K_{iA}}\right]}$	Zhao vd. 2008
Laktik asit (A) Etanol (B)	Lipaz	$r = \frac{r_{max}C_A C_B}{C_A C_B + K_A C_B \left[1 + \frac{C_B}{K_{iB}}\right] + K_B C_A \left[1 + \frac{C_A}{K_{iA}}\right]}$	Sun vd. 2010
Laktik asit (A) Etanol (B)	Lipaz	$r = \frac{r_{max}C_A C_B}{C_A C_B + K_A C_B \left[1 + \frac{C_B}{K_{iB}}\right] + K_B C_A \left[1 + \frac{C_A}{K_{iA}}\right]}$	Wang vd. 2010

Sun vd. (2010) çalışmalarında, etil laktat üretim tepkimesinin iki substrat inhibisyonlu Ping-Pong Bi-Bi kinetik modeline uyduğu göstermişlerdir. Kinetik çalışmalarında farklı etanol (5.6 ile 9.6 mol/L) ve laktik asit (0.5-5 mol/L) derişimlerinde çalışmışlardır. Enzim miktarı 80 mg'dır. Laktik asit ve etanol için inhibisyon sabitleri sırasıyla 0.061 ve 1.843 mol/L olarak bulunmuştur. Etanolün lipaz enzimine inhibitör etkisi bilinmektedir. Ancak çalışmada enzim inhibisyonunda laktik asitin etanolden daha önemli rol oynadığı görülmüştür. İç ve dış kütle aktarım kısıtlamaları ise ihmal edilebilir bulunmuştur.

Wang vd. (2010) çalışmalarında, etil laktat sentezi için amonyum laktat ve etanolü substrat olarak kullanmışlardır. Reaksiyon ortamında ilk olarak amonyum laktat, amonyak ve laktik asite dönüşmektedir. İkinci reaksiyonda ise laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesi gerçekleşmektedir. Çalışmada 0.2 mol/L amonyum laktat derişiminde ve farklı etanol derişimlerinde (6.8-8.8 mol/L) çalışılmıştır. Enzim miktarı ise 60 mg'dır. Bu çalışmada da etil laktat üretim reaksiyonu için iki substrat inhibisyonlu Ping-Pong Bi-Bi kinetik modeli önerilmiştir. Ayrıca amonyum laktatın laktik asite bozunması da dikkate alınmıştır. Laktik asit ve etanol için inhibisyon sabitleri sırasıyla 0.016 ve 0.38 mol/L olarak bulunmuştur. Yukarıdaki çalışmalara benzer şekilde laktik asitin etanole göre enzimi daha çok deaktive ettiği görülmüştür.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Esterleşme tepkimelerinde biyokatalizör olarak kullanılan tutuklanmış *Candida antartica* lipaz B (Novozym 435) üretici firmadan sağlanmıştır (<http://www.novozymes.com> 2015). Deneysel çalışmada kullanılan kimyasallar ve cihazlar sırasıyla EK 1 ve EK 2’de yer almaktadır.

Esterleşme reaksiyonundaki girdi ve ürünlerin kimyasal ve fiziksel özellikleri çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Esterleşme reaksiyonunda yer alan girdi ve ürünlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Özellik	Laktik Asit (LA) (Auras vd. 2011)	Etil alkol (EtOH) ¹	Etil Laktat (EL) ²	Su ³
IUPAC adlandırması	2-Hidroksi propiyonik asit	Etanol	Etil 2- hidroksi propanoat	Su
Molekül Ağırlığı	90.08	46.068	118.131	18.015
Molekül Formülü	C ₃ H ₆ O ₃	C ₂ H ₆ O	C ₅ H ₁₀ O ₃	H ₂ O
Renk/Görünüş	Sıvı veya katı	Renksiz sıvı	Renksiz sıvı	Renksiz sıvı
Erime Noktası (°C)	18 (Rasemik) 53 (-D ve -L)	-114.14	-25	0
Kaynama Noktası (°C)	122	78.29	154	99.97
Yoğunluk (g/ml)	1.224 (%100) 1.186 (%80.8)	0.789 (20°C)	1.0328 (20°C)	0.995 (25°C)
Viskozite (mPa.s)	28.5 (%85.3 LA) (25°C)	1.074 (20°C)	-	0.8949 (25°C)
Çözünürlük	Su, Etanol	Etil eter, aseton, kloroform, benzen, su ve çoğu organik çözücüde	Alkol, keton, ester, hidrokarbonlar, su	Etanol, metanol, aseton
logP	-0.72	-0.31	-0.18	-1.38

¹ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> 2018a

² <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> 2018b

³ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> 2018c

3.2 Yöntem

3.2.1 Çözücü hazırlanması

Çalışmada kullanılan hidrofilik ve hidrofobik derin ötektik çözücüler (DES) farklı hidrojen bağ donörleri (HBD) ve hidrojen bağ alıcıları (HBA) karıştırılarak elde edilmiştir. Hazırlanan hidrofilik ve hidrofobik DES'ler sırasıyla çizelge 3.2-3.3'de verilmiştir.

Hidrofilik Derin Ötektik Çözücüler

Hidrofilik DES'lerin hazırlanmasında Abbott vd. (2003), Shahbaz vd. (2010) ve Dai vd. (2013) kullandığı metotlar uygulanmıştır. Hidrofilik DES bileşenlerinden kolin klorür vakum desikatörde silika jel yardımı ile kurutularak saklanmıştır. Tartım yapıldıktan sonra cam şişelere alınarak kapağı kapatılmış ve hava ile teması mümkün olduğunca kesilmiştir. DES'ler kendini oluşturan bileşenleri belli mol oranlarında, belirli sıcaklıklarda sıcak su banyosunda homojen sıvı form elde edilene kadar karıştırılarak hazırlanmıştır.

Hidrofobik Derin Ötektik Çözücüler

Hidrofobik DES'lerin hazırlanmasında van Osch vd. (2015), Cao vd. (2017) ve Ge vd. (2017) kullandığı metotlar kullanılmıştır. Kullanılan bileşenlerden DL-mentol, desikatörde silika jel yardımı ile vakumda kurutularak saklanmıştır. DES'ler literatürde belirtilen sıcaklıklarda, bileşenlerin belli mol oranlarında sıcak su banyosunda homojen sıvı form elde edilene kadar karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

Biyočözücüler

Çalışmada biyočözücü olarak kullanılan ayçiçek yağı metil esteri (AYME) ve zeytinyağı metil esteri laboratuvarında hazırlanmıştır. Bunun için kullanılacak 100 g yağ, 10 ml hekzan içerisinde çözülmüş ve üzerine 100 µl 2 N KOH/metanol çözeltisi

eklenmiştir. Üst faz alınmış ve evaporatörde hekzan uzaklaştırılarak biyoçözücüler elde edilmiştir (<https://www.agilent.com> 2018d).

Çizelge 3.2 Hazırlanan hidrofilik DES ve bileşenleri

Bileşen 1	Bileşen 2	DES (mol oranı)	Kaynak
Kolin klorür	Glukoz	ChCl-Glu (1:1)	Dai vd. 2013
Kolin klorür	Glukoz	ChCl-Glu (5:2)	Dai vd. 2013
Kolin klorür	Fruktoz	ChCl-Fru (1:1)	Dai vd. 2013
Kolin klorür	Sukroz	ChCl-Suk (1:1)	Dai vd. 2013
Kolin klorür	Maltoz	ChCl-Malt (4:1)	Dai vd. 2013
Kolin klorür	Ksiloz	ChCl-Xyl (2:1)	Dai vd. 2013
Kolin klorür	Ksiloz	ChCl-Xyl (3:1)	Dai vd. 2013
Kolin klorür	Galaktoz	ChCl-Ga (5:2)	Dai vd. 2013
Kolin klorür	Gliserol	ChCl-Gly (1:2)	Dai vd. 2013
Kolin klorür	Gliserol	ChCl-Gly (1:1)	Dai vd. 2013
Kolin klorür	Gliserol	ChCl-Gly (3:2)	Dai vd. 2013
Kolin klorür	Üre	ChCl-Üre (1:2)	Zhang vd. 2012
Kolin klorür	Etilen glikol	ChCl-EG (1:2)	Zhang vd. 2012
Fruktoz	Sukroz	Fru-Suk (1:1)	Dai vd. 2013
L-Proline	Glukoz	Pro-Glu (5:3)	Dai vd. 2013

Çizelge 3.3 Hazırlanan hidrofobik DES ve bileşenleri

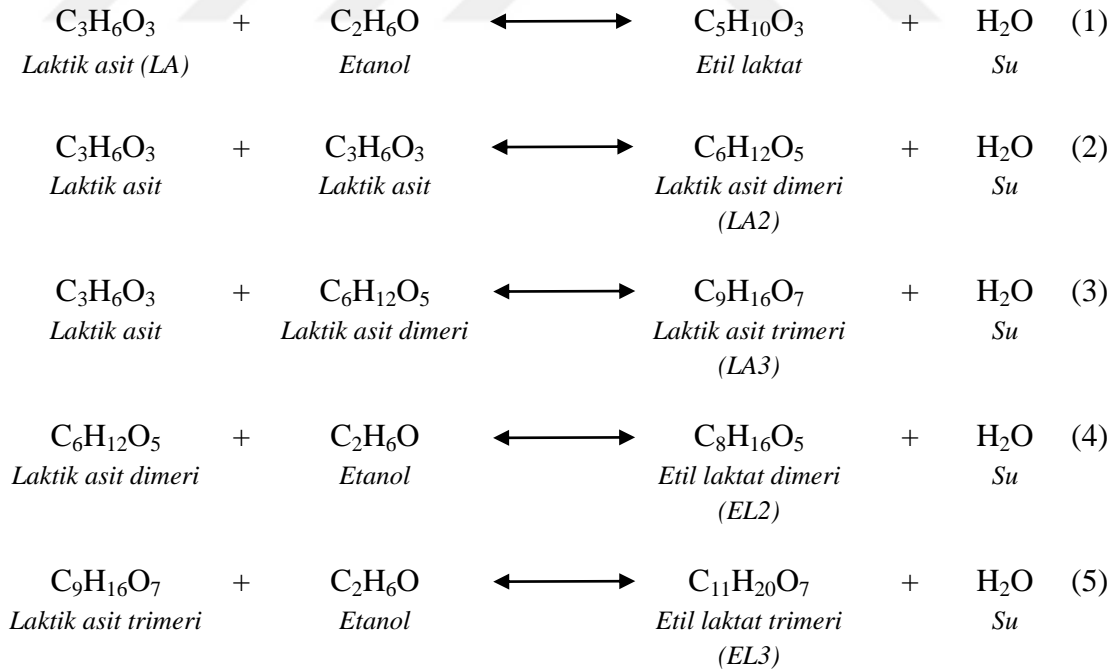
Bileşen 1	Bileşen 2	DES (mol oranı)	Kaynak
DL-Mentol	Oktanoik asit	Ment-OA (1:1)	Ge vd. 2017
DL-Mentol	Dekanoik asit	Ment-DA (1:1)	Ge vd. 2017
Aliquat 336	Dekanoik asit	A336-DA (1:2)	van Osch vd. 2015
Aliquat 336	Palmitik asit	A336-PA (1:2)	Cao vd. 2017
Aliquat 336	1-Dodekanol	A336-Dode (1:1)	Cao vd. 2017
Dekanoik asit	Lidokain	DA-Lid (3:1)	van Osch vd. 2016

3.2.2 Esterleşme tepkimesi

Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesi, hidrofil DES-su ikili karışımlarında Novozym 435 biyokatalizörlüğünde çalkalamalı hava banyosunda izoterm koşullarda 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ortamından 24 saat aralıklarla örnek

alınmış ve örnekler HPLC’de analiz edilerek sonuçları değerlendirilmiştir. Laktik asit dönüşümüne ve etil laktat verimine hidrofil DES türünün, DES-su ikili karışımındaki su miktarının, girdilerin başlangıç derişimlerinin, enzim derişiminin, reaksiyon sıcaklığının ve karıştırma hızının etkileri incelenmiştir.

Novozym 435 katalizörlüğünde derin ötektik çözücü ortamında gerçekleşen reaksiyonlar şekil 3.1’de yer almaktadır. Laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonu sonucu istenen ürün etil laktat oluşmaktadır (1). Reaksiyon girdilerinden laktik asit bifonksiyonel yapıdadır. Bu nedenle saklama ve tepkime esnasında derişik laktik asit çözeltilerinde karboksilik asitin hidroksil grupları bir araya gelerek (2) ve (3) numaralı reaksiyonlar da gerçekleşebilmektedir. Bu reaksiyonlarla oluşan laktik asit dimer ve trimerleri de etanol ile (4) ve (5) numaralı reaksiyonları vererek etil laktat dimer ve trimer yapılarını oluşturmaktadır. Ancak çalışma süresince saklama koşullarında girdi olarak kullanılan derişik laktik asit sulu çözeltilisinin içeriğinin değişmediği deneysel olarak belirlendiği için tepkime de ağırlıklı olarak (1) numaralı reaksiyon değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1 Tepkime karışımında gerçekleşen reaksiyonlar

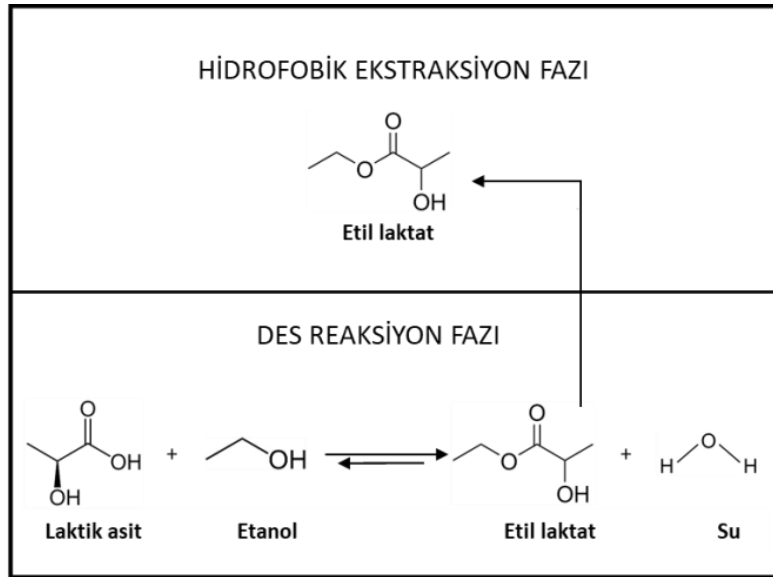
Çalışma kapsamındaki parametrelerin değerlendirilmesi için kullanılan dönüşüm (x) ve verim (Y) tanımları sırayla Eşitlik 3.1 ve 3.2’de verilmiştir.

$$Dönüşüm (x) = \frac{(C_{LA_0} + C_{LA_{2_0}} + C_{LA_{3_0}}) - (C_{LA} + C_{LA_2} + C_{LA_3})}{(C_{LA_0} + C_{LA_{2_0}} + C_{LA_{3_0}})} \times 100 \quad (3.1)$$

$$Verim (Y) = \frac{C_{EL}}{(C_{LA_0} + C_{LA_{2_0}} + C_{LA_{3_0}})} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.3 Ekstraktif reaksiyon sistemi

Ekstraktif reaksiyon sistemi tepkime ortamı üzerine hidrofobik faz (DES veya biyoçözücü) eklenerek hazırlanmıştır ($V_R/V_E=1$). Ekstraktif reaksiyon, laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesinde ulaşılan optimum çalışma koşullarında Novozym 435 biyokatalizörlüğünde çalkalamalı hava banyosunda 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Ekstraktif reaksiyon sistemin şematik gösterimi şekil 3.2’de verilmiştir. Reaksiyon ortamından 24 saat aralıklarla örnek alınarak HPLC’de analiz edilerek dönüşüm takip edilmiştir. Ekstraktif reaksiyon deneylerinde laktik asit dönüşümüne hidrofobik çözücü türü etkisi incelenmiştir.



Şekil 3.2 Ekstraktif reaksiyon sisteminin şematik gösterimi

3.2.4 Analizler

3.2.4.1 HPLC analizleri

Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesi ortamından alınan örneklerin analizleri HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada uygulanan HPLC koşulları çizelge 3.4'de yer almaktadır. Analizlerde taşıyıcı faz olarak kullanılan % 70: % 30 Asetonitril:Su ve % 0.1 : % 999 *o*-H₃PO₄:Su çözücüleri bidistile su kullanılarak hazırlanmıştır. Kullanımdan önce 0.45 µm PVDF membrandan vakumda süzölmüştür. Süzme işleminden sonra taşıyıcı fazlara 30 dk süre ile ultrasonik banyoda degaz işlemi yapılmıştır. HPLC'de çözücü akış hızınının 0.6 ml/dk ve taşıyıcı faz oranlarınının 20A-80B (h/h) olduğu izokratik program uygulanmıştır ve analiz süresi 20 dk'dır.

Laktik asit ve etil laktata ait kromatogramlar EK 3'de ve reaksiyon ortamına ait örnek bir kromatogram ise EK 4'de yer almaktadır. Laktik asit için kalma süresi 3.07 dk ve moleköl ağırlıklarına göre laktik asit dimeri ve trimeri olduğu kabul edilen yan ürünler için kalma süresi sırasıyla 3.99 ve 5.97 dk'dır. Etil laktat için kalma süresi ise 4.67 dk'dır. Hesaplamalarda kullanılmak üzere oluşturulan laktik asit ve etil laktat kalibrasyon grafikleri EK 5'de verilmiştir. Ayrıca HPLC cihazında gerçekleştirilen kantitatif analizlerin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacı ile tekrarlı analizler yapılmış ve standart sapma değeri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar EK 6'da verilmiştir.

Esterleşme tepkimesinin en uygun koşullarında elde edilen dönüşüm değerlerinin tekrarlanabilirliği ve doğruluğunun belirlenmesi amacı ile deneyler 3 kez tekrar edilmiş ve standart sapma değeri hesaplanmıştır. Sonuçlar EK 7'de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Esterleşme tepkimesi örneklerinin HPLC analiz koşulları

Özellik	Değer
Kolon	XTerra RP 18 (Waters)
Kolon boyutu	4.6 mm x 150 mm x 5 µm
Hareketli faz akış hızı	0.6 mL/dk
Kolon sıcaklığı	40°C
Dalga boyu	210 nm
Taşıyıcı faz A	% 70:% 30 asetonitril (ACN):H ₂ O
Taşıyıcı faz B	% 0.1:% 99.9 <i>o</i> -fosforik asit (o-H ₃ PO ₄): H ₂ O
Taşıyıcı faz oranları	% 20A:% 80B
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Analiz süresi	20 dakika

3.2.4.2 Lipaz aktivite tayini

Etil laktat üretiminde kullanılan lipaz (Novozym 435) aktivitesine *p*-nitrofenil asetatın lipaz katalizli hidrolizi spektrofotometrik yöntem ile takip edilerek karar verilmiştir. Hidroliz tepkimesi % 20 asetonitril ve % 80 pH 7, 50 mM potasyum fosfat tamponu ile hazırlanmış 4mM *p*-nitrofenil asetat çözeltisinde oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. 1 dakika sonra reaksiyon ortamından alınan örneğin 348 nm'de absorbans değeri okunmuş ve t=0 örneği ile arasındaki fark alınarak aktivite hesaplanmıştır. 1 Ünite (U) lipaz aktivitesi, 1 dakikada 1 µmol *p*-nitrofenol açığa çıkmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Dalmau vd. 2000). Reaksiyon ortamından alınan lipaz enzimi aktivite tayininden önce hekzan ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur (Aguieiras vd. 2016).

3.2.4.3 Elektriksel iletkenlik ölçümü

Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesinde kullanılan ChCl-Gly (1:2) DES'inin iletkenlik ölçümleri yapılmıştır.

3.2.4.4 Vizkosite ölçümü

Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesinde kullanılan ChCl-Gly (1:2) DES'inin vizkositesi ölçülmüştür.

3.2.4.5 pH ölçümü

Lipaz aktivite tayininde kullanılmak üzere pH 7 50 mM potasyum fosfat tamponu hazırlanarak pH ölçümü yapılmıştır.

3.2.4.6 Yoğunluk ölçümü

Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesinde kullanılan ChCl:Gly (1:2) DES'inin yoğunluğu piknometre ile ölçülmüştür.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Derin Ötektik Çözücü Ortamında Laktik Asitin Etanol ile Esterleşme Tepkimesi

Laktik asitin etanol ile Novozym 435 lipaz enzimi katalizli esterleşme reaksiyonu ile etil laktat üretimi kesikli işletim sisteminde izoterm koşullarda gerçekleştirilmiştir. Etil laktat üretiminde dönüşüm, verim ve başlangıç reaksiyon hızına derin ötektik çözücü türü, DES'in su içeriği, başlangıç girdi derişimi, enzim miktarı, sıcaklık ve karıştırma hızı etkisi incelenmiştir. Reaksiyon ortamından alınan örnekler girdi ve ürün için Bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi HPLC'de analizlenmiş ve elde edilen veriler ile Eşitlik 3.1 ve Eşitlik 3.2 kullanılarak dönüşüm ve verim değerleri hesaplanmıştır.

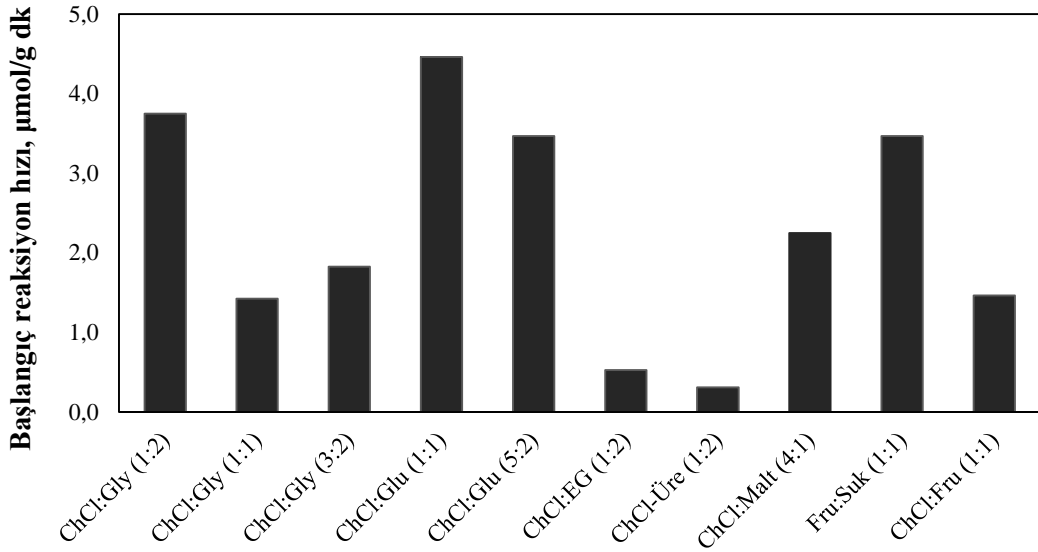
4.1.1 Reaksiyon ortamı için uygun derin ötektik çözücü seçimi

Etil laktatın Novozym 435 lipaz enzimi katalizörlüğünde üretimi farklı derin ötektik çözücülerde gerçekleştirilerek çözücü türünün başlangıç reaksiyon hızına etkisi araştırılmıştır. Tepkimeler izoterm koşullarda çalkalamalı hava banyosunda cam şişelerde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon toplam hacmi 10 mL'dir. Laktik asit ve etanol için başlangıç girdi derişimleri ile enzim derişimi sırasıyla 0.81 M, 6.72 M ve 30 mg/mL'dir. Reaksiyon % 10 DES-su ikili karışımlarında 50 °C ve 200 rpm koşullarda gerçekleştirilmiş ve 72 saat sonunda sonlandırılmıştır.

Çalışmada çizelge 3.2'de verilen hidrofil derin ötektik çözücüler kullanılmıştır. Hazırlanan hidrofil derin ötektik çözücülerden ChCl-Fru (1:1), ChCl-Xyl (2:1), ChCl-Xyl (3:1), ChCl-Ga (5:2) ve Pro-Glu (5:3) kararsız olmaları nedeniyle tepkimelerde kullanılmamıştır. Girdi ve ürünlerin kullanılan hidrofil derin ötektik çözücülerdeki çözünürlükleri deneysel olarak kontrol edilmiş ve çözündükleri görülmüştür. Reaksiyonda DES'lerin katalitik etki göstermedikleri ön denemeler ile belirlenmiştir. Ayrıca reaksiyon süresince hacim değişimi görülmemiştir.

Şekil 4.1’de hidrofil derin ötektik çözücüler için elde edilen başlangıç reaksiyon hızları verilmiştir. Başlangıç reaksiyon hızının düşük elde edildiği ortamlar ChCl-EG (1:2) ve ChCl-Üre (1:2) ortamlarıdır. En yüksek başlangıç reaksiyon hızları ise ChCl-Glu (1:1) ve ChCl-Gly (1:2) ortamlarıdır ve sırasıyla 4.46 ve 3.75 $\mu\text{mol/gdk}$ olarak elde edilmiştir.

Laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonu için ChCl-Gly (1:2) çözücü olarak seçilmiştir. ChCl-Gly (1:2) ortamında yüksek başlangıç reaksiyon hızlarından biri elde edilmiştir. Gliserol biyodizel endüstrisinin atığıdır ve derin ötektik çözücü hazırlanarak değerlendirilebilir. Ayrıca ChCl-Gly (1:2) DES’in diğer DES’lere göre hazırlanması daha kolaydır. Literatürde de, esterleşme ve transesterleşme tepkimelerinde en iyi sonuç veren derin ötektik çözücüler ChCl-Gly (1:2) ve ChCl-Üre (1:2) DES’leri olmuştur (Kazlauskas vd. 2010, Durand vd. 2012, Ülger ve Takaç 2017).



Şekil 4.1 Farklı derin ötektik çözücü ortamlarında elde edilen reaksiyon başlangıç hızları

($C_{A0}=0.81$ M, $C_{B0}=6.72$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=10$ mL, $T=50$ °C, $N=200$ rpm)

Etil Laktat Üretiminde Kullanılan Çözücü ChCl-Gly (1:2) Özellikleri

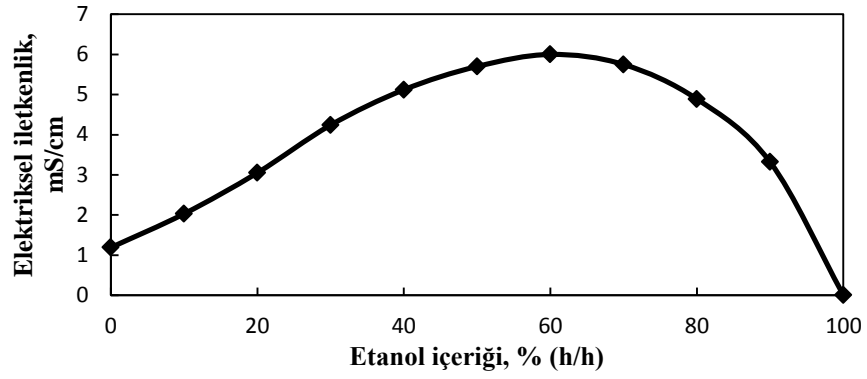
Laktik asitin enzimatik esterleşme tepkimesi ile etil laktat üretiminde çözücü olarak kullanılacak olan ChCl-Gly (1:2) DES’inin elektiksel iletkenlik, viskozite ve yoğunluk

gibi özellikleri belirlenmiştir. Çizelge 4.1’de ölçülen özellikler ve 25 °C sıcaklıktaki değerleri yer almaktadır. Bu değerler, literatürde ChCl-Gly (1:2) için 25 °C sıcaklıktaki elektriksel iletkenlik (1.3 mS/cm) (Garcia vd. 2015), viskozite (259 cP) (D’Agostino vd. 2011) ve yoğunluk (1.18 g/mL) (Abbott vd. 2011) değerleri ile uyum göstermektedir.

Çizelge 4.1 Derin ötektik çözücü ChCl-Gly (1:2) özellikleri

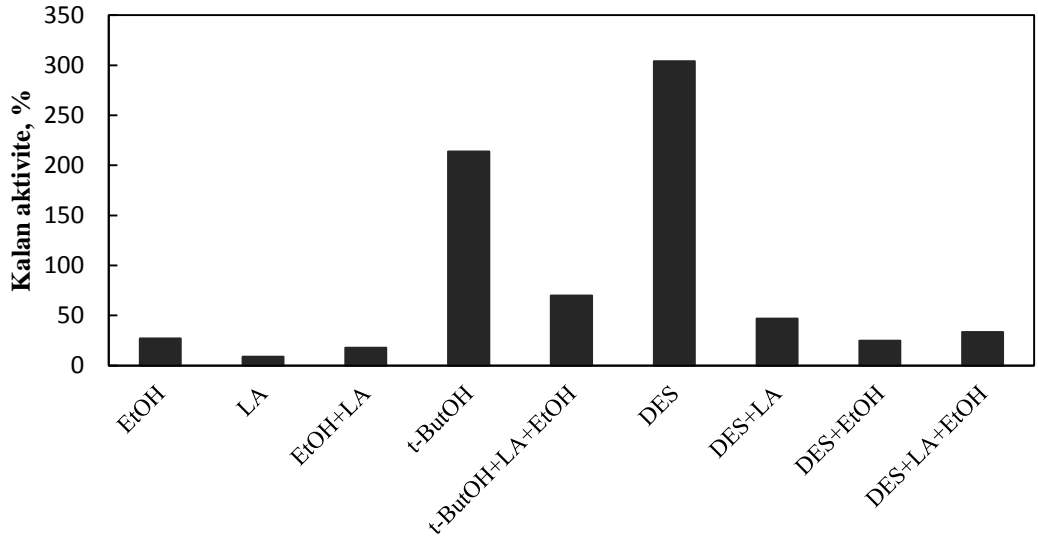
Özellik	Değer
Elektriksel iletkenlik, mS/cm	1.189
Viskozite, cP	351
Yoğunluk, g/mL	1.181

Derin ötektik çözücülerde bileşenler hidrojen bağları ile bağlanmaktadır. DES ortamına eklenen alkol veya su gibi bileşenlerin miktarına bağlı olarak hidrojen bağları kırılarak DES yapısı bozulabilmektedir. DES’in yapısındaki bozulma, elektriksel iletkenlik takip edilerek anlaşılabilir. Elektriksel iletkenlik su veya alkol içeriği arttıkça artarken bir noktadan sonra azalmaktadır (Ünlü vd. 2017). Azalmanın görüldüğü noktadan sonra derin ötektik çözücü yapısı bozulmaktadır. Su miktarı (% 0-20 (h/h)) ile ChCl-Gly (1:2) DES’in elektriksel iletkenliğinin değişimi araştırma grubumuzda daha önce yapılan bir çalışma ile incelenmiştir (Ülger 2016). Çalışmada ChCl-Gly (1:2) su içeriği % 0-20 (h/h) arasında değiştirildiğinde elektriksel iletkenliğin 1.25 mS/cm değerinden 11.46 mS/cm değerine arttığı ve bu çalışma aralığında ChCl-Gly (1:2) yapısının bozulmadığı görülmüştür. Bu yüksek lisans çalışmasında ise etanol miktarı (% 0-100 (h/h)) ile ChCl-Gly (1:2) DES’in elektriksel iletkenliği incelenmiş ve elde edilen grafik şekil 4.2’de verilmiştir. ChCl-Gly (1:2):etanol çözeltisinin elektriksel iletkenliğinin % 60 (h/h) etanol içeriğine kadar arttığı ve sonrasında azaldığı görülmüştür. ChCl-Gly (1:2) DES yapısının % 60 (h/h) etanol içeriğinden sonra bozulduğu sonucuna varılmıştır. Tepkime ortamları bu sonuç göz önüne alınarak hazırlanmıştır.



Şekil 4.2 Derin ötektik çözücü ChCl-Gly (1:2) etanolün içeriği ile elektriksel iletkenliğinin değişimi

Etil laktatın enzimatik üretiminde çözücü olarak seçilen DES ChCl-Gly (1:2)'ün Novozym 435 lipaz enzimi aktivitesine etkisi, literatürde çözücü olarak kullanılan t-bütanolün enzim aktivitesine etkisi ile karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir. Substratlar laktik asit, etanol ve tepkime ortamlarının da enzim aktivitesine etkileri ayrıca incelenmiştir. Bu amaçla Novozym 435 lipaz enziminin eklendiği farklı ortamlar, 24 saat boyunca 50 °C ve 200 rpm koşullarda çalkalamalı hava banyosunda bekletilmiştir. 24 saat sonunda ortamlardan enzim ayrılmış; yıkama işleminden sonra kurutularak aktivite tayini yapılmıştır. Sonuçlar şekil 4.3'de verilmiştir. Ticari Novozym 435 lipaz enzimi aktivitesi % 100 olarak referans alınmıştır. Literatür çalışmalarında kullanılan t-bütanolün enzim aktivitesini 2 kat arttırdığı görülürken, etanol ve laktik asit varlığı ile aktivitede düşme olmuştur. Bu çalışmada kullanılan DES ChCl-Gly (1:2) çözücü ortamında ise enzim aktivitesi 3 kat artarak % 304'e çıkmıştır. Etanol ve laktik asitin bulunduğu ChCl-Gly (1:2) ortamlarında ise aktivitede düşme görülmektedir. Laktik asit ve etanol ortamlarında enzimin kalan aktivitesi sırasıyla % 9 ve % 27'dir. Literatürde de laktik asit ve etanolün ticari Novozym 435 lipaz enzimini deaktive ettiğini gösteren çalışmalar yer almaktadır (José vd. 2011). Ancak, bu çalışmada laktik asit ile etanol substratlarına ChCl-Gly (1:2) eklenerek enzim üzerindeki inhibisyon etkilerinin azaltıldığı bulunmuştur. Bu nedenle enzimatik esterleşme tepkimesinin ChCl-Gly (1:2) ortamında gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

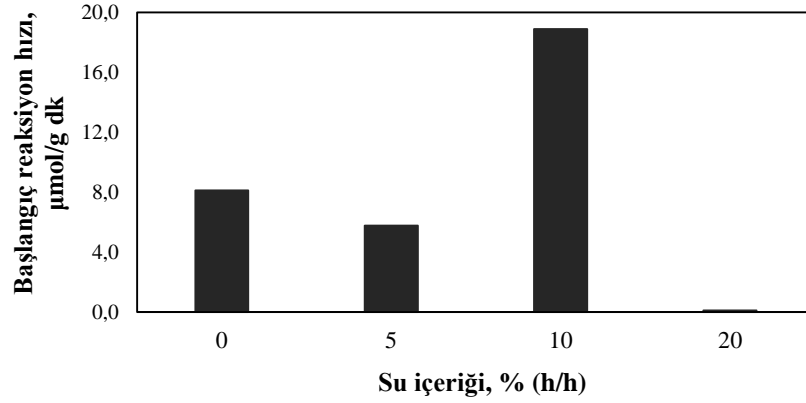


Şekil 4.3 Farklı çalışma ortamlarındaki Novozym 435 enzimi için kalan aktivite değerleri
(t=24 saat, T=50°C, N=200 rpm)

4.1.2 Su içeriği etkisi

Laktik asitin etanol ile Novozym 435 lipaz enzimi katalizli esterleşme tepkimesinde ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımının su içeriğinin başlangıç reaksiyon hızına etkisi % 0, 5, 10 ve 20 (h/h) olmak üzere 4 farklı değerde incelenmiştir. Reaksiyon, çalkalamalı hava banyosunda izoterm koşullarda cam şişelerde gerçekleştirilmiştir. ChCl-Gly (1:2) hacimce % 50 ve alkol:asit mol oranı 1:1 olacak şekilde farklı su içeriklerinde tepkime ortamları hazırlanmıştır. Sıcaklık 50 °C ve karıştırma hızı 200 rpm'dir. Katalizör Novozym 435 derişimi ise 30 mg/mL'dir. Tepkime 72 saat sonunda sonlandırılmıştır.

ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında gerçekleştirilen etil laktat üretiminde farklı su içeriklerinde elde edilen başlangıç reaksiyon hızları şekil 4.4'de verilmiştir. Başlangıç reaksiyon hızları % 0, 5, 10 ve 20 (h/h) su içerikleri için sırasıyla 8.12, 5.76, 18.89 ve 0.1 µmol/gdk olarak hesaplanmıştır. Enzimatik reaksiyonlarda enzim aktivitesi için bir miktar su gereklidir. Enzim aktivitesi için gereken suyun fazlasının ortama konulması laktik asit ile etanolün esterleşme tepkimesi ile oluşan etil laktatın hidrolizine neden olmaktadır. Bu nedenle ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımının su içeriği % 20 (h/h) değerine çıktığında reaksiyon hızında önemli bir azalma olmuştur.



Şekil 4.4 Farklı su içeriklerindeki ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımlarında elde edilen başlangıç reaksiyon hızları

($C_{A0}/C_{B0}=1$, $C_{E0}=30$ mg/mL, $T=50$ °C, $N=200$ rpm)

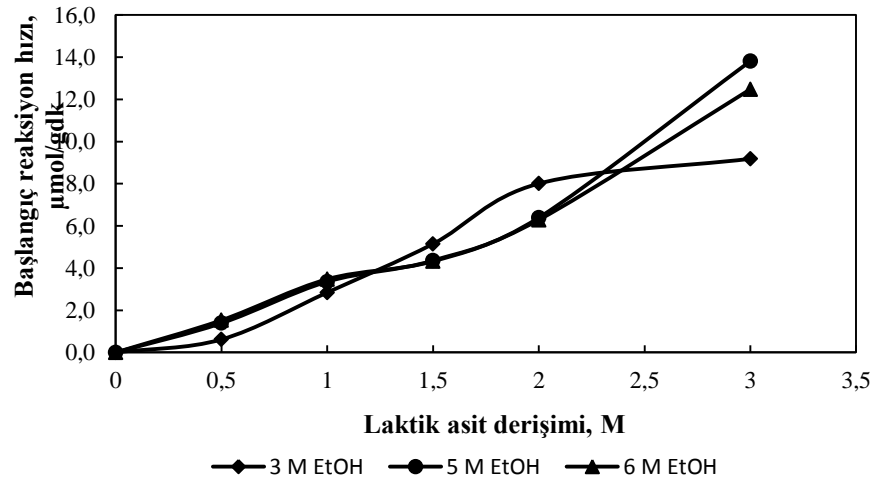
İyonik sıvı ortamında rasemik laktik asitin etanol ile enzimatik esterleşme reaksiyonunda ortam su içeriğinin (% 8-14 (h/h)) dönüşüme etkisini inceleyen Findrik vd. (2012), su içeriğinin artması ile dönüşümde önemli oranda azalma olduğunu görmüştür. Benzer şekilde ortamdaki suyun artışı ile reaksiyon ters yönde ilerlemiş ve hidroliz reaksiyonu hızında artış olmuştur. Bu çalışmada da, başlangıç reaksiyon hızında en yüksek değere % 10 (h/h) su içeriğinde ulaşılmıştır. Bu nedenle laktik asitin etanol ile enzimatik esterleşme tepkimesinde dönüşüm, verim ve başlangıç reaksiyon hızına başlangıç girdi derişimi, enzim derişimi, sıcaklık ve karıştırma hızı gibi parametrelerin etkisi incelenirken, tepkimeler % 10 (h/h) su içeren ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında gerçekleştirilmiştir.

4.1.3 Başlangıç girdi derişimleri etkisi

ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında laktik asitin etanol ile Novozym 435 lipaz enzimi katalizli esterleşme tepkimesinde laktik asit ve etanolün başlangıç derişimlerinin dönüşüm, verim ve başlangıç reaksiyon hızına etkisi incelenmiştir. Reaksiyon % 10 (h/h) su içeren ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında farklı laktik asit (0.5, 1, 1.5, 2, 3 M) ve etanol (3, 5, 6 M) derişimlerinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon toplam hacmi 10 mL ve katalizör Novozym 435 derişimi 30 mg/mL'dir. Reaksiyon 50 °C sıcaklık ve 200

rpm karıştırma hızında çalkalamalı hava banyosunda gerçekleştirilmiştir. 24 saatte bir örnek alınarak HPLC’de analiz edilmiştir. Tepkime 72 saat sonunda sonlandırılmıştır.

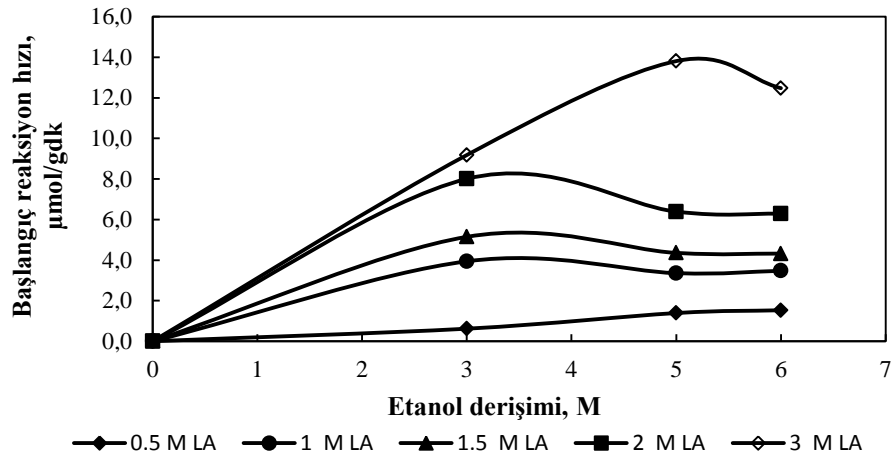
ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında elde edilen başlangıç reaksiyon hızlarının, farklı etanol derişimlerinde laktik asit derişimi ile değişimi ve farklı laktik asit derişimlerinde etanol derişimi ile değişimleri sırasıyla şekil 4.5-4.6’da verilmiştir. 72 saat sonunda elde edilen dönüşüm ve verimler ise sırasıyla şekil 4.7-4.8’de yer almaktadır. Esterleşme reaksiyonları karboksilik asitin kısmi ayrışması ile reaksiyon ortamına H⁺ iyonu vermesi nedeniyle otokatalitik olarak ilerlemektedir. Otokatalitik reaksiyon hızı karboksilik asitin otoprotoliz hızına bağlı olarak değişmektedir ve reaksiyon hızının artırılması için katalizör kullanımı gerekmektedir. Ancak laktik asitin asitlik sabitinin pKa=3.86 (25 °C) olması nedeniyle pH değeri oldukça düşüktür. Bu da reaksiyon ortamında H⁺ iyonlarının çok olması ve otokatalitik reaksiyon hızının fazla olmasına neden olmaktadır (Pereira vd. 2011). Bu nedenle şekil 4.5 incelendiğinde laktik asit derişiminin artması ile başlangıç reaksiyon hızının artması, enzim katalizli reaksiyon ile birlikte otokatalitik reaksiyonun hızının da artmasıyla açıklanabilir. ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında ve çalışılan etanol derişim aralığında bu girdinin enzim üzerinde etkisinin çok fazla olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.5 ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında farklı etanol derişimlerinde (3, 5 ve 6 M) farklı laktik asit derişimlerine karşılık başlangıç reaksiyon hızları

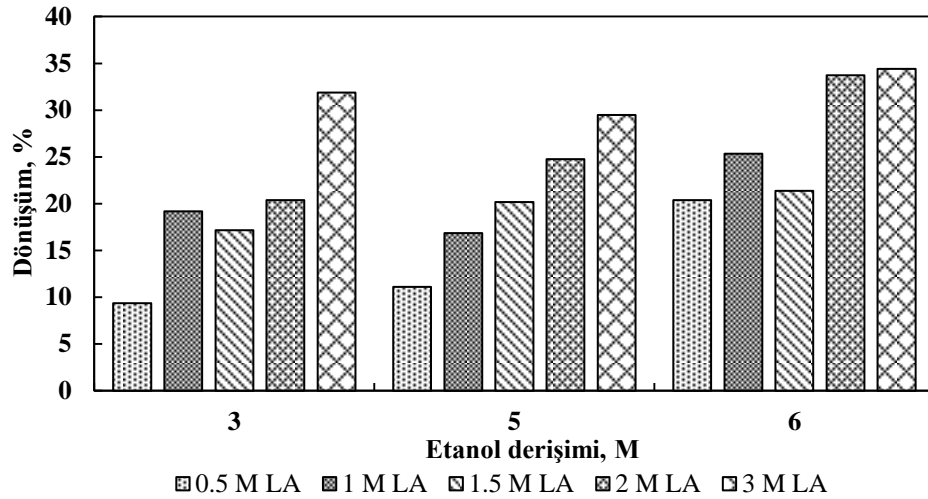
(C_{E0}=30 mg/mL, T=50 °C, N=200 rpm)

Şekil 4.6’da farklı laktik asit derişimlerinde etanol derişimi ile başlangıç hızının değişimi görölmektedir. Tüm laktik asit derişimleri için etanol derişiminin artması ile reaksiyon hızı önce artmış sonra yaklaşık sabit kalmış veya biraz azalmıştır. 5 M etanol derişiminden sonraki azalma ise etanolün substrat inhibisyonuna neden olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, en yüksek başlangıç reaksiyon hızına ulaşılan 5 M etanol ve 3 M laktik asit derişimleri en uygun girdi derişimi olarak seçilmiştir.

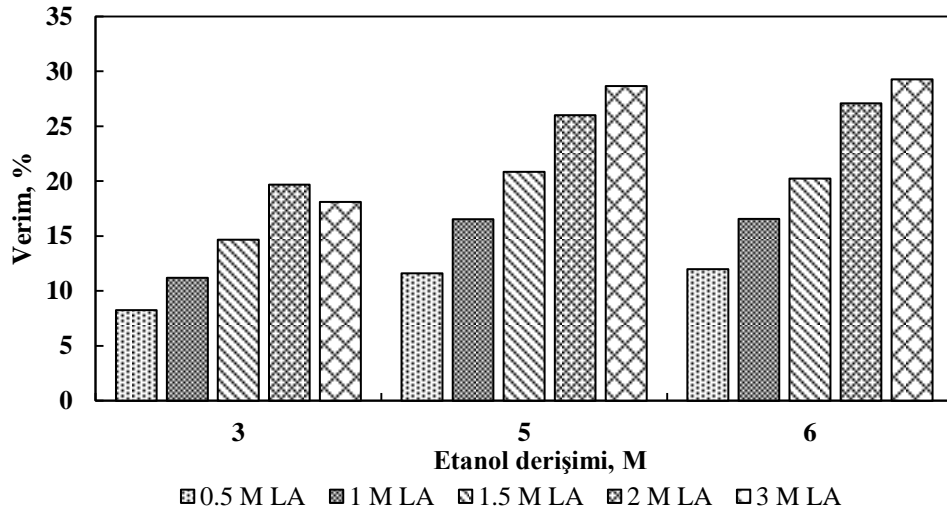


Şekil 4.6 ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımlarında farklı laktik asit derişimlerinde (0.5, 1, 1.5, 2 ve 3 M) farklı etanol derişimlerine karşılık başlangıç reaksiyon hızları ($C_{E0}=30$ mg/mL, $T=50$ °C, $N=200$ rpm)

Şekil 4.7’de her etanol derişiminde laktik asit derişiminin artması ile dönüşümün arttığı görölmektedir. Dönüşüme paralel olarak verimde de artış olduğu şekil 4.8’de görölmektedir. En uygun başlangıç girdi derişimlerine başlangıç reaksiyon hız değerine göre karar verilmiştir. En yüksek başlangıç reaksiyon hızına 3 M laktik asit ve 5 M etanol derişiminde 13.81 $\mu\text{mol/gdk}$ değerinde ulaşılmıştır. Bu nedenle, laktik asitin etanol ile ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında gerçekleşen enzimatik esterleşme tepkimesine enzim derişimi, sıcaklık ve karıştırma hızı etkisi incelenirken 5 M etanol ve 3 M laktik asit derişimlerinde çalışılmıştır ($C_{B0}/C_{A0}=1.67$). Bu başlangıç girdi derişimlerinde 72 saat sonunda ulaşılan laktik asit dönüşüm ve etil laktat verim değerleri sırasıyla % 29.47 ve % 28.68’dir.



Şekil 4.7 ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımlarında farklı laktik asit derişimlerinde (0.5, 1, 1.5, 2 ve 3 M) farklı etanol derişimlerine karşılık 72 saat dönüşüm değerleri ($C_{E0}=30$ mg/mL, $T=50$ °C, $N=200$ rpm)



Şekil 4.8 ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımlarında farklı laktik asit derişimlerinde (0.5, 1, 1.5, 2 ve 3 M) farklı etanol derişimlerine karşılık 72 saat verim değerleri ($C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=10$ mL, $T=50$ °C, $N=200$ rpm)

Sun vd. (2010) t-bütanol ortamında gerçekleştirdikleri laktik asitin etanol ile Novozym 435 katalizli esterleşme reaksiyonunda, etil laktat verimine girdi derişim etkisini alkol/asit mol oranı (6.32, 7, 8, 9, 9.68) ve toplam substrat miktarı (0.23, 0.3, 0.4, 0.5, 0.57 g) olmak üzere iki parametre ile incelemiştir. Toplam substrat miktarı artarken verim önce artıp bir noktadan sonra azalmıştır. Bu durum, etanolün lipaz üzerinde inhibitör etkisi nedeniyle optimum çalışma derişiminin olması ile açıklanmıştır. Bu

nedenle etanolün arttırılması ile etil laktat verimi düzenli olarak artmamıştır. Benzer durum toplam substrat etkisinde de görülmüştür. Bir noktadan sonra etil laktat veriminin azalma nedeninin ortamda yüksek derişimde olan substratların inhibisyon etkisi veya enzim aktif bölgelerine güçlü bir şekilde adsorplanması şeklinde açıklanmıştır.

Wang vd. (2010), Novozym 435 katalizörlüğünde ve t-bütanol ortamında laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonunda, reaksiyon hızına laktik asit (0.05-0.25 M) ve etanol (6.8, 8.8 M) derişimi etkisini incelemişlerdir. Laktik asit ve etanol derişiminin artması ile reaksiyon hızında önce artış ve bir noktadan sonra azalış görülmüştür. Sun vd. (2010) çalışmasına benzer şekilde iki substrat inhibisyonu olduğu söylenmiştir.

Bélafi-Bakó vd. (2002), organik çözücü heptan ortamında asetik asitin etanol ile enzimatik esterleşme reaksiyonunda, başlangıç reaksiyon hızına asetik asit (0.05-4.2 mol/L) ve etanol (2.2-10.9 mol/L) derişiminin etkisini incelemişlerdir. Asetik asit derişimi arttıkça başlangıç reaksiyon hızında önce artış sonra azalış gözlenmiştir. Ancak azalmanın görüldüğü asetik asit derişimleri farklıdır. Ortamdaki etanol miktarı artmasıyla birlikte inhibisyonun görüldüğü asetik asit derişim değeri artmıştır. Etanol derişimi 2.2 mol/L'den 4.4 mol/L'ye arttırıldığında başlangıç reaksiyon hızında artış olurken, 4.4 mol/L'den yüksek etanol derişimlerinde başlangıç reaksiyon hızında azalma olmuştur. Bu durum, etanol derişiminin 2.2 mol/L'den 4.4 mol/L'ye arttırılması ile etanolün enzimi asetik asitin inhibisyon etkisinden koruduğu şeklinde açıklanmıştır. Ancak etanol derişiminin 4.4 mol/L üzerine çıkarılması, enzim üzerinde asit inhibisyonunun yanı sıra alkol inhibisyonuna da neden olmuştur.

4.1.4 Enzim derişimi etkisi

ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında laktik asitin etanol ile enzimatik esterleşme tepkimesinde dönüşüm, verim ve başlangıç reaksiyon hızına enzim derişiminin etkisi 10, 30, 50, 70 ve 90 mg/mL olmak üzere 5 farklı değerde incelenmiştir. Reaksiyon, toplam hacim 10 mL olacak şekilde % 10 (h/h) su içeren ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında gerçekleştirilmiştir. Laktik asit ve etanol için başlangıç girdi derişimleri

sırasıyla 3 ve 5 M'dır. Çalkalamalı hava banyosunda 50 °C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında çalışılmıştır. 72 saat sonunda sonlandırılan reaksiyonda 24 saatte bir örnek alınarak HPLC'de analiz edilmiştir.

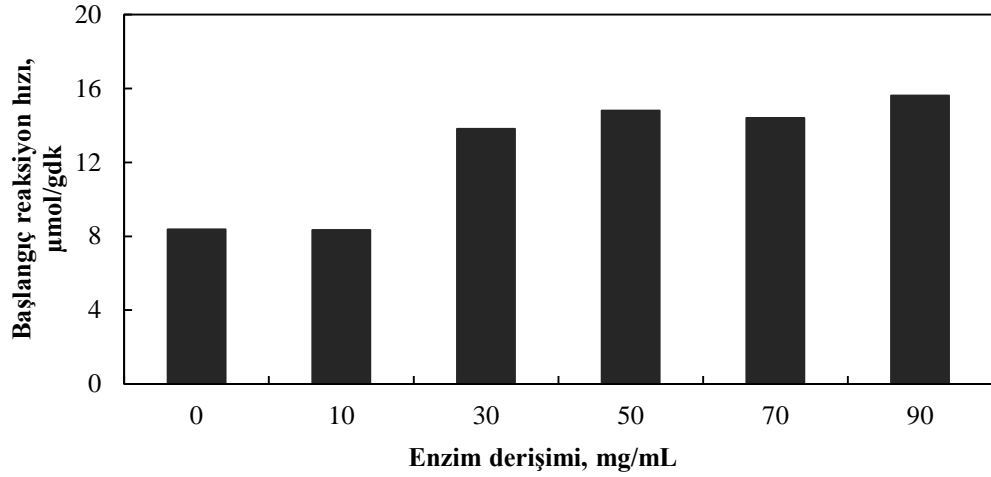
Şekil 4.9'da farklı enzim derişimlerinde elde edilen başlangıç reaksiyon hızları yer almaktadır. Reaksiyon ortamına katalizör Novozym 435 eklenmediğinde durumda da reaksiyonun otokatalitik olarak ilerlemesi nedeniyle laktik asit dönüşümü gerçekleşmiştir ve elde edilen reaksiyon hızı 8.38 $\mu\text{mol/gdk}$ 'dır. Reaksiyon ortamına 10 mg/mL Novozym 435 enzimi eklendiğinde başlangıç reaksiyon hızında artış görülmemiştir. Enzim derişiminin 10 mg/mL değerinden 30 mg/mL değerine çıkması ile başlangıç reaksiyon hızında 1.65 kat artış olmuş ve 13.81 $\mu\text{mol/gdk}$ hız değerine ulaşılmıştır.

Dönüşüm ve verim değerlerinin zamanla değişimi sırasıyla şekil 4.10-4.11'de yer almaktadır. Değerler incelendiğinde dönüşüm ve verimde zamanla artış olduğu görülmektedir. Hacimce % 10 su içeren ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında gerçekleştirilen laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonunda uygun enzim derişimi 30 mg/mL olarak bulunmuştur. Bu koşullarda elde edilen laktik asit dönüşümü ve etil laktat verimi 72 saat sonunda sırasıyla % 29.47 ve % 28.68 olarak elde edilmiştir.

Laktik asitin etanol ile enzimatik esterleşme reaksiyonunu organik çözücü t-bütanol ortamında gerçekleştiren Huang vd. (2009) başlangıç reaksiyon hızına enzim derişimi etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, enzim derişimi arttırıldıkça reaksiyon hızının daha fazla artmadığı gözlenmiştir. Bu, enzim miktarı arttıkça enziminin homojen dağılımını koruyamaması nedeniyle reaksiyon hızında değişim görülmediği şeklinde açıklanmıştır.

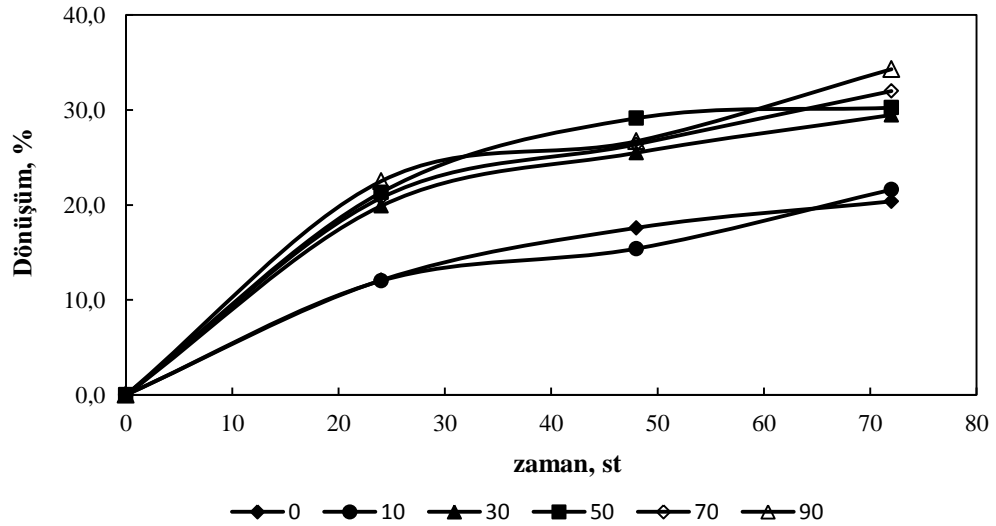
Findrik vd. (2012), iyonik sıvı ortamında yaptıkları rasemik laktik asitin etanol ile enzimatik esterleşme reaksiyonunda iyonik sıvı kütlesi/enzim kütlesi oranının (10, 15, 20) laktik asit dönüşümüne etkisini incelemişlerdir. Yüksek alkol/asit mol oranında (11:1) gerçekleştirilen reaksiyonda iyonik sıvı kütlesi/enzim kütlesi oranı arttıkça dönüşüm önemli oranda artmıştır. Çalışmada, rasemik laktik asit kullanılması nedeniyle iyonik sıvı kütlesi/enzim kütlesi oranının dönüşümün yanı sıra enantiyomerik aşırılığa

etkisi de incelenmiştir. Yüksek alkol/asit mol oranında (11:1) gerçekleştirilen reaksiyonda iyonik sıvı kütlesi/enzim kütlesi oranı arttıkça dönüşüm artsa da enantiyomerik aşırılıkta artış görülmemiştir. Bu nedenle iyonik sıvı kütlesi/enzim kütlesi etkisi önemsiz sayılmıştır.



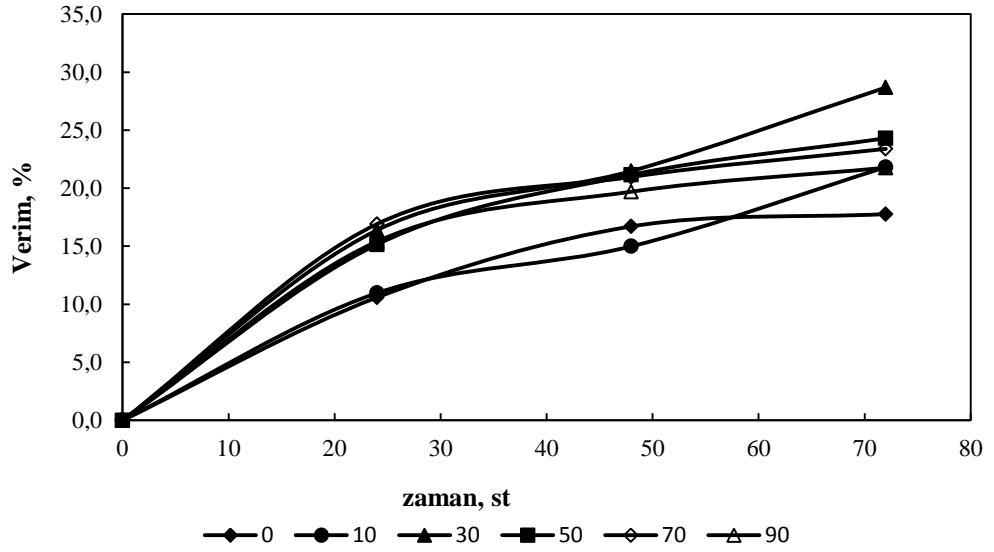
Şekil 4.9 Farklı enzim derişimlerinde ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımlarında elde edilen başlangıç reaksiyon hızları

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $T=50$ °C, $V_T=10$ mL, $N=200$ rpm)



Şekil 4.10 Farklı enzim derişimlerinde ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımlarında dönüşüm değerlerinin zamanla değişimi

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $T=50$ °C, $V_T=10$ mL, $N=200$ rpm, $t=72$ saat)



Şekil 4.11 Farklı enzim derişimlerinde ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımlarında verimin zamanla değişimi

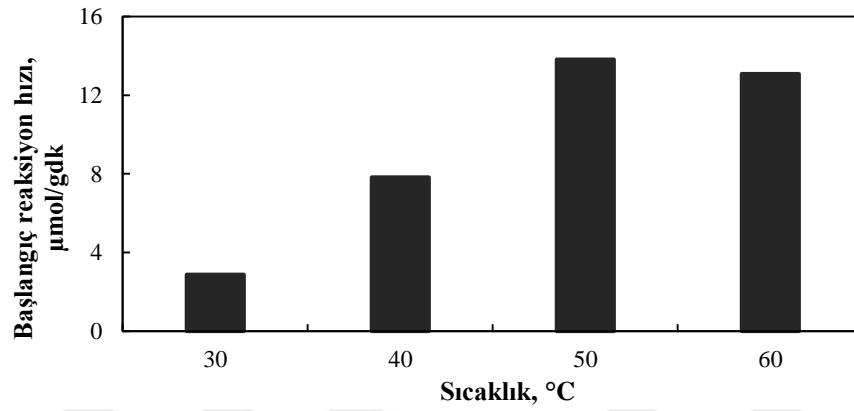
($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $T=50$ °C, $V_T=10$ mL, $N=200$ rpm, $t=72$ saat)

4.1.5 Sıcaklık etkisi

ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında gerçekleştirilen enzimatik esterleşme tepkimesi ile etil laktat üretiminde dönüşüm, verim ve başlangıç reaksiyon hızına sıcaklık etkisi 30, 40, 50 ve 60 °C olmak üzere 4 farklı değerde incelenmiştir. Reaksiyon 200 rpm karıştırma hızında çalkalamalı hava banyosunda izoterm koşullarda gerçekleştirilmiştir. Hacimce % 10 su içeren ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında gerçekleştirilen reaksiyonun toplam hacmi 10 mL'dir. Laktik asit ve etanol için başlangıç derişimleri sırasıyla 3 ve 5 M'dir. 24 saatte bir örnek alınmış ve HPLC'de analiz edilmiştir. 72 saat sonunda reaksiyon sonlandırılmıştır. Farklı sıcaklıklarda elde edilen başlangıç reaksiyon hızı, dönüşüm ve verim grafikleri sırasıyla şekil 4.12-4.14'de verilmiştir. Arrhenius yasası gereği reaksiyon sıcaklığı arttıkça reaksiyon hızındaki artış beklenen bir durumdur. Ancak enzimatik reaksiyonlarda enzimin yüksek sıcaklıklarda deaktive olması nedeniyle reaksiyon hızında artış görülmemektedir. Novozym 435 lipaz enziminin optimum çalışma sıcaklıklarında (30-60 °C) gerçekleştirilen çalışmada sıcaklığın 30 °C'den 50 °C'ye artırılması ile başlangıç reaksiyon hızında, dönüşüm ve verimde artış olduğu görülmektedir. Sıcaklığın 60 °C'ye artırıldığında reaksiyon hızı 50 °C'ye göre azalmıştır. Dönüşüm ve verim değerleri 50 °C'de elde edilen değerler ile

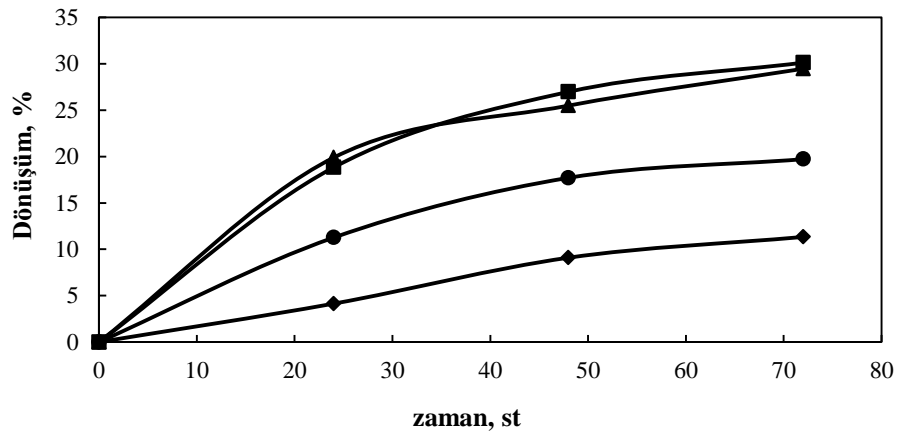
benzerdir. Bu şekilde, ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında laktik asitin enzimatik esterleşme reaksiyonu için uygun tepkime sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, enzimatik esterleşme reaksiyonu için 50 °C sıcaklıktaki koşullarda elde edilen dönüşüm ve verim değerleri 72 saat için sırasıyla % 29.47 ve % 28.68'dir.

Huang vd. (2009) t-bütanol ortamında gerçekleştirdikleri laktik asitin etanol ile enzimatik esterleşme reaksiyonunda 20-70 °C sıcaklık aralığında çalışmışlar ve 60 °C'ye kadar Novozym 435 enzimin deaktive olmadığını göstermişlerdir.



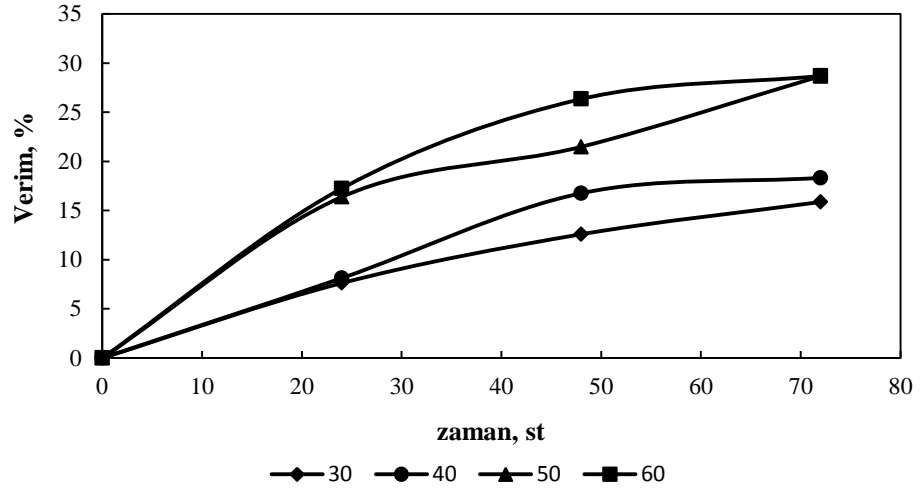
Şekil 4.12 Farklı sıcaklıklarda ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında elde edilen başlangıç reaksiyon hızları

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=10$ mL, $N=200$ rpm)



Şekil 4.13 Farklı sıcaklıklarda ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında dönüşümün zamanla değişimi

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=10$ mL, $N=200$ rpm, $t=72$ saat)

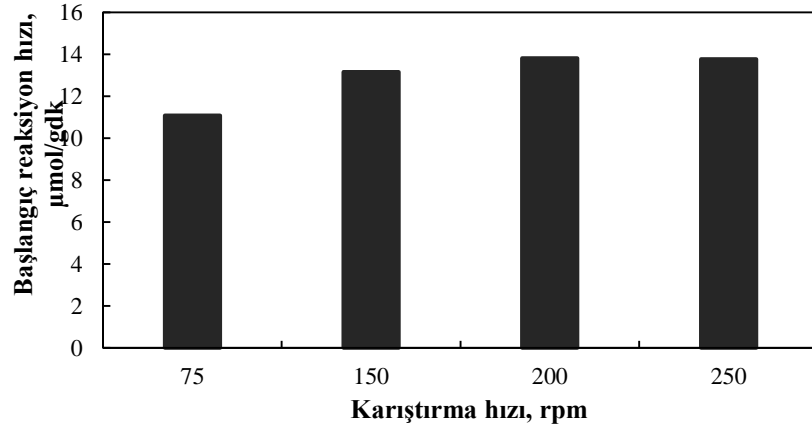


Şekil 4.14 Farklı sıcaklıklarda ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında dönüşümün zamanla değişimi

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=10$ mL, $N=200$ rpm, $t=72$ saat)

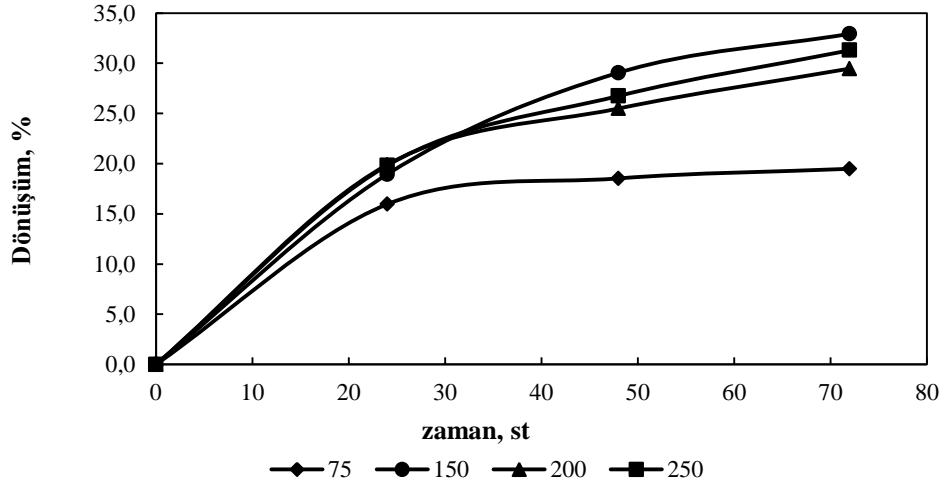
4.1.6 Karıştırma hızı etkisi

ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında gerçekleştirilen laktik asitin etanol ile Novozym 435 enzim katalizli esterleşme reaksiyonunda dönüşüm, verim ve başlangıç reaksiyon hızına karıştırma hızının etkisi 75, 150, 200 ve 250 rpm olmak üzere 4 farklı değerde incelenmiştir. Reaksiyon 50 °C sıcaklıkta izoterm koşullarda çalkalamalı hava banyosunda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon toplam hacmi 10 mL'dir. Hacimce % 10 su içeren ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında gerçekleştirilen reaksiyonda laktik asit ve etanol için başlangıç girdi derişimleri sırasıyla 3 ve 5 M'dir. 24 saatte bir örnek alınmış ve HPLC'de analiz edilmiştir. Reaksiyon 72 saat sonunda sonlandırılmıştır. Başlangıç reaksiyon hızı, dönüşüm ve verim için elde edilen grafikler sırasıyla şekil 4.14-4.16'da yer almaktadır. Karıştırma hızının 75 rpm değerinden 150 rpm ve 200 rpm değerine artması ile başlangıç reaksiyon hızı, dönüşüm ve verimde artış olmuştur. Karıştırma hızının artmasıyla yığın kütle aktarımındaki kısıtlamaların azalması nedeniyle bu beklenen bir durumdur. Karıştırma hızı 200-250 rpm arasında değiştiğinde başlangıç reaksiyon hızında önemli bir artış olmamıştır. Karıştırma hızının 200 rpm olduğu koşullarda 13.81 μ mol/gdk olarak en yüksek reaksiyon hızına ulaşılmıştır. Bu koşullarda elde edilen dönüşüm ve verim değerleri 72 saat için sırasıyla % 29.47 ve 28.68'dir.



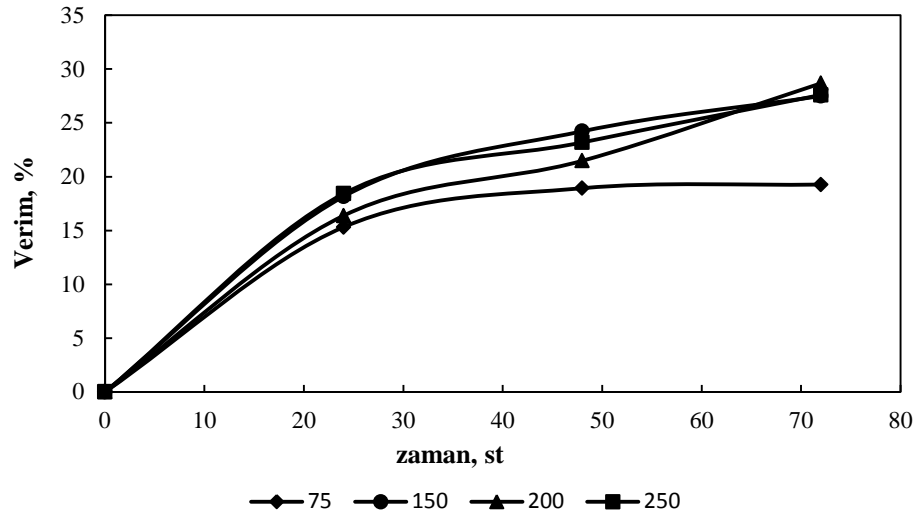
Şekil 4.15 Farklı karıştırma hızlarında ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında elde edilen başlangıç reaksiyon hızları

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=10$ mL, $T=50$ °C)



Şekil 4.16 Farklı karıştırma hızlarında ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında dönüşümün zamanla değişimi

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=10$ mL, $T=50$ °C, $t=72$ saat)



Şekil 4.17 Farklı karıştırma hızlarında ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında verimin zamanla değişimi

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=10$ mL, $T=50$ °C, $t=72$ saat)

4.2 Derin Ötektik Çözücü Ortamında Laktik Asitin Etanol ile Esterleşme Tepkimesi Kinetiği

ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında laktik asitin etanol ile Novozym 435 lipaz enzimi esterleşme tepkimesi ile etil laktat üretimi heterojen reaksiyon ortamında gerçekleşmektedir. Çalışmada kullanılan Novozym 435 lipazı tutuklanmış bir enzimdir ve tutuklanmış enzimlerde tepkime, iç ve dış yayılım kısıtlamalarından da etkilenebilmektedir. Kütle aktarım hızı reaksiyon hızından yavaş ise gözlenen hız kütle aktarım kısıtlamaları nedeniyle yavaş olacaktır. Bu yüksek lisans çalışması kapsamında, dış yayılım ve iç yayılım etkileri incelenmiştir. Dış yayılım etkisi farklı karıştırma hızlarında elde edilen başlangıç reaksiyon hızlarının karşılaştırılarak; iç yayılım etkisi ise farklı enzim derişimlerinde elde edilen başlangıç reaksiyon hızı karşılaştırılarak ve Thiele Modülü hesaplanarak incelenmiştir.

4.2.1 Dış yayılım etkisi

Enzimatik esterleşme reaksiyonu ile etil laktat üretimi heterojen tepkime sisteminde gerçekleştirilmektedir. Bu tür tepkimelerde dış yayılımın etkisi, karıştırma hızı ile

reaksiyon hızının değişimi incelenerek bulunabilir. Dış yayılım direncinin ihmal edilebilmesi için karıştırma hızı ile başlangıç reaksiyon hızının değişmemesi gerekmektedir. Şekil 4.15 incelendiğinde 75-150 rpm arasında karıştırma hızı ile başlangıç reaksiyon hızında artış olduğu görülmektedir. Bu nedenle bu aralıkta dış yayılım etkisi ihmal edilemez. Ancak karıştırma hızının 150-250 rpm arasında değişmesi ile başlangıç reaksiyon hızında önemli artış olmamaktadır. Çalışmada 200 rpm karıştırma hızında çalışıldığı için dış yayılım direnci ihmal edilmiştir.

Sun vd. (2010) lipaz katalizli laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonu ile etil laktat üretiminde dış yayılım etkisini, karıştırma hızının reaksiyon hızına etkisini belirleyerek incelemişlerdir. Karıştırma hızı 50-150 rpm arasında değiştirildiğinde reaksiyon hızı da değişmiştir. Karıştırma hızı 150 rpm ve üzerindeki iken reaksiyon hızında değişim görülmemiştir. Çalışmada 150 rpm karıştırma hızında çalışıldığı için dış yayılım direnci ihmal edilmiştir. Ülger ve Takaç (2017) derin ötektik çözücü ortamında Novozym 435 katalizörlüğünde gerçekleştirdikleri propil gallat ile metanolün transesterleşme tepkimesinde, dış yayılım etkisini karıştırma hızı ile reaksiyon hızının değişimi ile incelemişlerdir. Karıştırma hızının 75 rpm'den 200 rpm'e artırılması ile reaksiyon hızı artmıştır. Ancak 200-250 rpm arasında reaksiyon hızı değişmemiştir. Bu nedenle 200 rpm çalışma koşullarında dış yayılım direnci ihmal edilmiştir.

4.2.2 İç yayılım etkisi

İç yayılım etkisi, enzim derişimi ile reaksiyon hızındaki değişim karşılaştırılarak ve Thiele Modülü hesaplanarak iki şekilde incelenmiştir. Heterojen tepkime sistemlerinde, iç yayılım etkisi, enzim derişimi ile reaksiyon hızındaki değişim izlenerek elde edilebilmektedir. İç yayılım direncinin ihmal edilebilmesi için enzim derişimi arttıkça başlangıç reaksiyon hızında da artış olmalıdır. Bu çalışmada, enzim derişimi 10 mg/mL'den 30 mg/mL değerine arttırıldığında başlangıç reaksiyon hızının doğrusal bir şekilde arttığı şekil 4.9'da görülmektedir. Bu aralıkta iç yayılım direnci ihmal edilebilir. Enzim derişiminin 30-90 mg/mL arasında değişmesi ile reaksiyon hızında artış olmaması iç yayılım direncinin bu aralıkta ihmal edilebilir olmadığı göstermektedir.

Çalışmada, iç yayılım direncinin görülmediği 30 mg/mL enzim derişimi değerinde çalışılmıştır.

Tutuklanmış enzimlerde, reaksiyonun enzim aktif bölgelerinde gerçekleşebilmesi için substratın gözeneklerden içeri difüzenmesi gerekmektedir. Bu nedenle substratın gözenek içine yayılım hızı, aktif bölgelerde gerçekleşen reaksiyon hızını etkilemektedir. Tutuklanmış enzimlerin katalizör olarak kullanıldığı sistemlerde iç yayılım etkisinin incelenmesindeki parametre Thiele Modülü (Φ)'dür. Thiele Modülü, reaksiyon hızı ile iç yayılım arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Thiele Modülü Eşitlik 4.1'de verilmiştir.

$$\Phi = \frac{r_0}{D_E C_{S0}} \left(\frac{V_P}{A_P} \right)^2 \quad (4.1)$$

Burada;

r_0	Başlangıç reaksiyon hızı, mol/Lst
D_E	Etkin yayılım katsayısı, cm^2/st
C_{S0}	Enzim yüzeyindeki başlangıç girdi derişimi, mol/L
V_P	Pellet hacmi, cm^3
A_P	Pellet yüzey alanı, cm^2

dır.

Thiele Modülünün hesaplanması için gerekli olan hız, gerçek hız ölçümünün zor olması nedeniyle gözlenen hız olarak yazılırsa Thiele Modülü, "Gözlenen Thiele Modülü" olarak adlandırılır. Tutuklanmış enzim için tutuklama matris yapısı küresel kabul edildiğinde Gözlenen Thiele Modülü Eşitlik 4.2 ile ifade edilmektedir (Duan vd. 1997, Ülger ve Takaç 2017).

$$\Phi = \frac{r_0}{D_E C_{S0}} \left(\frac{R_p}{3} \right)^2 \quad (4.2)$$

Burada;

R_p Enzim matrisi yarıçapı, cm

dır.

Etkin yayılım katsayısı (D_E) ve sıvılarda substrat difüzyon katsayısı (D_S) için kullanılan denklemler sırasıyla Eşitlik 4.3 ve Eşitlik 4.4'de yer almaktadır (Duan vd. 1997, Ülger ve Takaç 2017).

$$D_E = D_S \frac{\varepsilon_p}{\tau} \sigma \quad (4.3)$$

$$D_S = \frac{k T}{\mu} V_S^{0.33} \quad (4.4)$$

Burada;

D_E	Etkin yayılım katsayısı, cm^2/s
D_S	Substrat difüzyon katsayısı, cm^2/s
ε_p	Pellet gözenekliliği
τ	Pellet kıvrım faktörü
σ	Daralma oranı
k	Sabit
μ	Tepkime ortamı viskozitesi, cP
T	Tepkime sıcaklığı, K
V_S	Substrat molar hacmi, cm^3 (V_A ve V_B)

dır.

Thiele modülü (Φ), etkin yayılım katsayısı (D_E) ve sıvılarda substrat difüzyon katsayısı (D_S) değerlerinin hesaplanması için gerekli parametreler laktik asit ve etanol girdileri için literatür çalışmalarından elde edilmiştir ve çizelge 4.2'de yer almaktadır (Duan vd. 1997, Ülger ve Takaç 2017).

Çizelge 4.2 Gözlenen Thiele Modülü hesaplamasında kullanılacak parametreler ve literatür değerleri

Parametre	Değer	Kaynak
R_p	0.045 cm	Yadav ve Devi 2001
ϵ_p	0.5	Ülger ve Takaç 2017
τ	6	Ülger ve Takaç 2017
k	17.5×10^{-8}	Ülger ve Takaç 2017
μ	351 cP (ChCl-Gly (1:2))	Bu çalışma
T	353 K (50 °C)	-
V_A	74.45 cm ³	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov 2018e
V_B	58.32 cm ³	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov 2018a

Daralma faktörü σ , substrat molekül yarıçapı katalizör gözenek yarıçapından küçük olduğu durumlarda ihmal edilebilir (Duan vd. 1997) ve bu çalışmada ihmal edilmiştir. Çizelge 4.2'deki değerler kullanılarak laktik asit için hesaplanan D_S değeri 7.29×10^{-7} cm²/s'dir. Hesaplanan D_S değeri kullanılarak D_E değeri 6.07×10^{-8} cm²/s (2.18×10^{-4} cm²/st)'dir. Etanol için çizelge 4.2'deki değerler kullanılarak D_S ve D_E değerleri sırasıyla 6.73×10^{-7} cm²/s ve 5.6×10^{-8} cm²/s (2.02×10^{-4} cm²/st) olarak hesaplanmıştır.

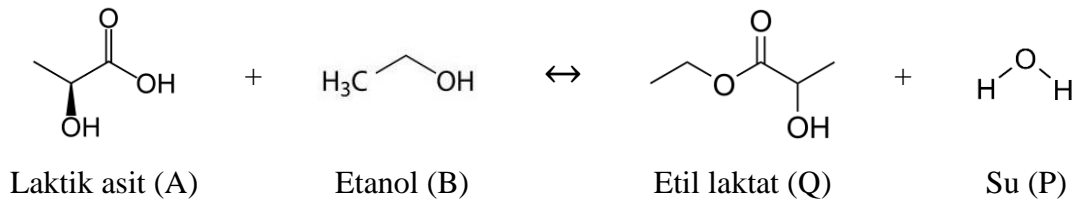
Eşitlik 4.2'deki C_{S0} enzim yüzeyindeki başlangıç girdi derişimidir. Dış yayılım etkisi ihmal edildiği için C_{S0} , yığındaki başlangıç laktik asit ve etanol derişimi olarak alınmıştır. Laktik asit için Gözlenen Thiele Modülü, ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında gerçekleştirilen laktik asitin etanol ile enzimatik esterleşme tepkimesi için optimum koşullarda ($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $T=50$ °C, $V_T=10$ mL, $N=200$ rpm) hesaplanmıştır. Çalışılan 3 M laktik asit derişiminde Gözlenen Thiele Modülü değeri 0.0085 olarak hesaplanmıştır. Çalışılan 5 M etanol derişiminde hesaplanan Gözlenen Thiele Modülü ise 0.0055'dir. Weisz's kriterine göre Thiele Modülünün 0.3'den küçük olduğu ($\Phi < 0.3$) durumlarda iç yayılım direnci ihmal edilebilir düzeydedir (Zhang vd. 2004). Bu çalışmada da çalışılan koşulda Gözlenen Thiele Modülü 0.3'den küçük olması nedeniyle laktik asit ve etanol için iç yayılım dirençleri ihmal edilmiştir.

4.2.3 Tepkime kinetik modeli

İki substratlı enzimatik tepkimeler için hız modeli olarak Ping-Pong Bi-Bi modeli önerilmektedir (Segel 1975). Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesi de iki substratlı bir tepkimedir ve enzim katalizözlüğünde gerçekleştiğinde hız modeli Ping-Pong Bi-Bi hız modeline uymaktadır (Sun vd. 2010).

Organik çözücü hekzan ortamında gerçekleştirilen izovalerik asit ile etanolün enzimatik esterleşme tepkimesi Chowdary ve Prapulla (2005), tarafından Pin Pong B Bi modeli ile açıklanmıştır. Bu mekanizmaya ait basamakların şekil 4.18’de verilen laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonu için de geçerli olduğu varsayılırsa, ilk olarak enzim (E) açıl donörü laktik asit (A) ile birleşerek enzim-açıl kompleksini (E.A) oluşturmaktadır. Enzim-açıl kompleksi oluşuktan sonra ilk ürün su açığa çıkmaktadır. Enzim-açıl-alkol kompleksi (E.Ac.B) oluşturmak üzere ikinci substrat etanol (B), enzim-açıl-kompleksi (E.A) ile birleşmektedir. Enzim-açıl-alkol kompleksi (E.Ac.B), serbest enzim (E) ve ürün etil laktata (Q) ayrılmaktadır. Burada, asit (E.Ac.A) ve alkolün (E.B) enzim ile tersinmez bir şekilde oluşturduğu bağlar ise inhibisyona neden olmaktadır.

Laktik asitin etanol ile enzimatik esterleşme reaksiyonu için önerilen Ping-Pong Bi-Bi kinetik model mekanizmasının şematik gösterimi şekil 4.19’da yer almaktadır.

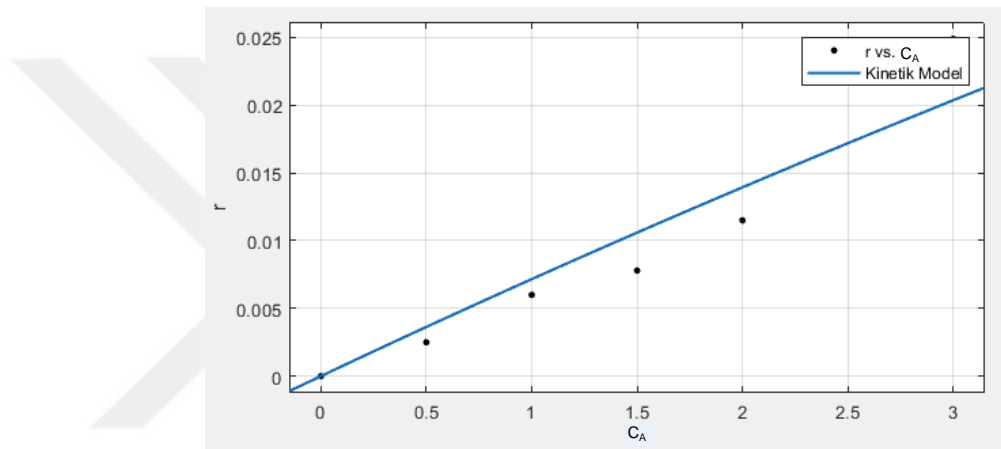


Şekil 4.18 Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesi

için önerilen kinetik modelin deneysel veriler ile uyumluluğu, etanol inhibisyonunun olduğunu ve genel hız denklemini olarak Eşitlik 4.1'in kullanılabileceğini göstermiştir.

Çizelge 4.3 Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesi kinetik modeli için MATLAB Eğri Uyum Aracı ile belirlenen katsayı değerleri

Katsayı	Değer
r_{\max} , mol/Lst	0.2659
K_A , mol/L	0.8285
K_B , mol/L	0.0774
K_{iB} , mol/L	0.1174



Şekil 4.20 Laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesinde önerilen kinetik model için laktik asit derişimine (C_A) karşı başlangıç reaksiyon hızları (r) grafiği

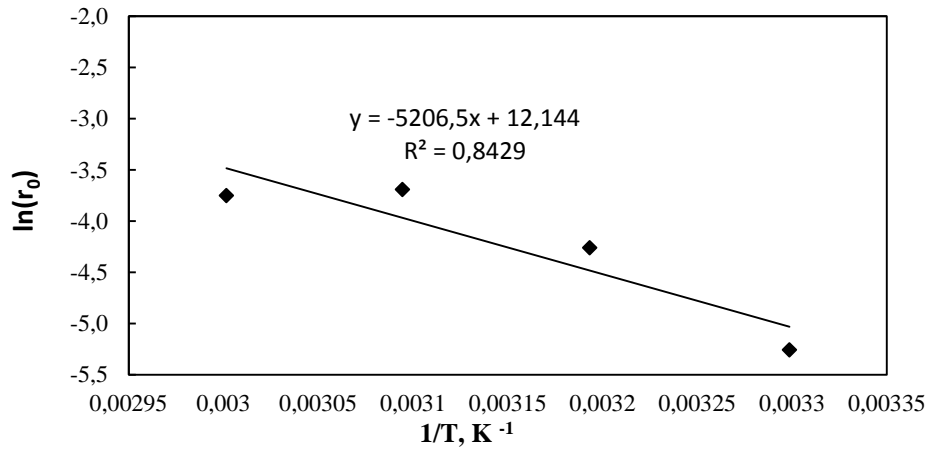
Literatürde, laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonunu t-bütanol ortamında lipaz katalizli inceleyen Sun vd. (2010) reaksiyonun kinetik modelinin iki substrat inhibisyonlu Ping-Pong Bi-Bi modeline uyduğunu bildirmişlerdir. Kinetik model katsayıları r_{\max} , K_A , K_B , K_{iA} ve K_{iB} değerlerini sırasıyla 0.00146 mol/Lst, 0.023 mol/L, 0.394 mol/L, 0.061 mol/L ve 1.843 mol/L olarak hesaplanmıştır. İnhibisyon katsayılarına göre laktik asitin enzimi etanole göre daha çok inhibe ettiği görülmüştür.

4.2.4 Tepkime aktivasyon enerjisi

ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında gerçekleştirilen Novozym 435 katalizli laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesi için aktivasyon enerjisi, şekil 4.12'deki farklı

sıcaklıklarda elde edilen başlangıç reaksiyon hızları kullanılarak hesaplanmıştır. Tepkime aktivasyon enerjisini bulmak amacıyla Arrhenius grafiği ($1/T - \ln r_0$) çizilmiştir (Şekil 4.21). Grafikte elde edilen doğru denkleminin eğimi $-E_A/R$ ve kayması $\ln A$ değerini vermektedir. Arrhenius grafiği kullanılarak (Şekil 4.21) hesaplanan tepkime aktivasyon enerjisi 43.28 kJ/mol olarak bulunmuştur.

Literatürde, laktik asitin lipaz katalizörlüğünde etanol ile esterleşme reaksiyonunun aktivasyon enerjisi için bilgi yer almamaktadır. Ancak, etil laktat üretimi çözücüsüz ortamda ve iyon değiştirici reçine katalizörlüğünde gerçekleştiren Zhang vd. (2004), tepkime aktivasyon enerjisini 51.58 kJ/mol olarak bildirmişlerdir.



Şekil 4.21 Etil laktat üretimine ait Arrhenius grafiği

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=10$ mL, $N=200$ rpm)

4.3 Ekstraktif Reaksiyon Sisteminde Laktik Asitin Etanol ile Esterleşme Tepkimesi

Laktik asitin etanol ile Novozym 435 lipaz enzimi katalizli esterleşme reaksiyonu sonucu etil laktat üretimi, ChCl-Gly (1:2) ortamında kesikli işletim sisteminde izoterm koşullarda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada incelenen parametreler ve elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1’de verilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde ise, hidrofil derin ötektik çözücü ChCl-Gly (1:2) ortamında gerçekleştirilen tepkime için belirlenen en uygun koşullarda, reaksiyon ortamına hidrofobik bir çözücü eklenerek ekstraktif reaksiyon

işlemi uygulanmıştır. Laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonu termodinamik denge kısıtlaması olan tersinir bir reaksiyondur. Bu denge kısıtlaması, Le Châtelier prensibine göre girdi derişimini yüksek tutarak veya ürünlerden birini sürekli olarak ortamdan uzaklaştırarak aşılabilir. Bu çalışmada, esterleşme reaksiyonunun ileri yönde ilerlemesi ve dönüşümün arttırılması amacıyla hibrit sistemlerden biri olan ekstraktif reaksiyon sistemi denenmiştir. Bu amaçla ekstraksiyon fazı olarak hidrofob yapıda çeşitli derin ötektik çözücü ve biyoçözücüler hazırlanmış veya temin edilmiştir. Çift fazlı reaksiyon ortamından örnek alınarak hidrofil ortamlar HPLC’de analiz edilmiştir.

4.3.1 Hidrofobik çözücü seçimi

Ekstraktif reaksiyon ile etil laktat üretim reaksiyonunun şematik gösterimi şekil 3.2’de yer almaktadır. Sistemde, hidrofilik ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında enzimatik esterleşme reaksiyonu ile üretilen etil laktatın hidrofobik çözücü fazına geçmesi amaçlanmaktadır. Etil laktat hidrofobik faza ekstrakte olurken reaksiyon ortamındaki hidrofil çözücü, girdiler laktik asit ve etanol ile diğer bir ürün suyun hidrofobik ortama geçmemesi istenmektedir. Bu nedenle, kullanılan hidrofobik çözücülerin etanol ve su ile karışmadığı kalitatif olarak, laktik asit ve etil laktat ile karışıp karışmadığı ise kantitatif olarak incelenmiştir.

Ekstraksiyon ortamı olarak kullanılan hidrofob DES’ler çizelge 3.3’de yer almaktadır. Hidrofobik derin ötektik çözücüler (Ment-OA (1:1), Ment-DA (1:1), A336-DA (1:2), A336-PA (1:2), A336-Dode (1:1) ve DA-Lid (3:1)), zeytinyağı ve ayçiçek yağı metil esterleri ile gliseril trioktanoat ve gliseril trioleat çözücülerinin su ve etanol ile karışıp karışmadığına hacim değişimi takip edilerek bakılmıştır. A336-PA (1:2) ve DA-Lid (3:1) derin ötektik çözücülerinin su ile karıştığı görülmüştür. Kullanılan tüm hidrofobik çözücüler, etanol ile tamamen karışmasa da etanol hacminde azalma görülmüş ve etanolün bir kısmı hidrofob faza geçmiştir.

Laktik asit ve etil laktatın su ile karışmayan hidrofob çözücülerde çözünüp çözünmediğinin belirlenmesi için, hidrofobik çözücüler, ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında ayrı ayrı hazırlanan laktik asit ve etil laktat çözeltileri ile hacimce 1:1

oranında karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi oda sıcaklığında 10 dakika süreyle vortekslenerek yapılmıştır. Laktik asit ve etil laktat çözeltilerinin analizleri HPLC cihazında çizelge 3.4'deki koşullarda gerçekleştirilmiş ve hidrofilik fazdan hidrofobik faza geçen laktik asit ve etil laktat miktarları yüzde mol olarak hesaplanarak çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4'de hem laktik asitin hem etil laktatın hidrofobik fazlara geçtiği görülmektedir. Laktik asit ve etil laktat, hidrofobik derin ötektik çözücülere yüksek oranda geçerken, gliseril trioktanoat ve gliseril trioleat fazlarına daha az geçmiştir. Zeytinyağı metil esteri ve ayçiçek yağı metil esteri çözücü fazlarına ise etil laktat sırasıyla % 51 ve % 57 geçerken laktik asit % 5 ve % 12 geçmiştir. Hidrofil fazdan hidrofob faza laktik asitin etil laktata göre daha az ekstrakte olması ve zeytinyağına göre daha az maliyetli olması nedeniyle ekstraktif reaksiyonda kullanılacak en uygun hidrofob çözücünün ayçiçek yağı metil esteri olduğuna karar verilmiştir.

Çizelge 4.4 Hidrofilik fazdan hidrofobik ekstraksiyon fazına geçen laktik asit ve etil laktat yüzde değerleri

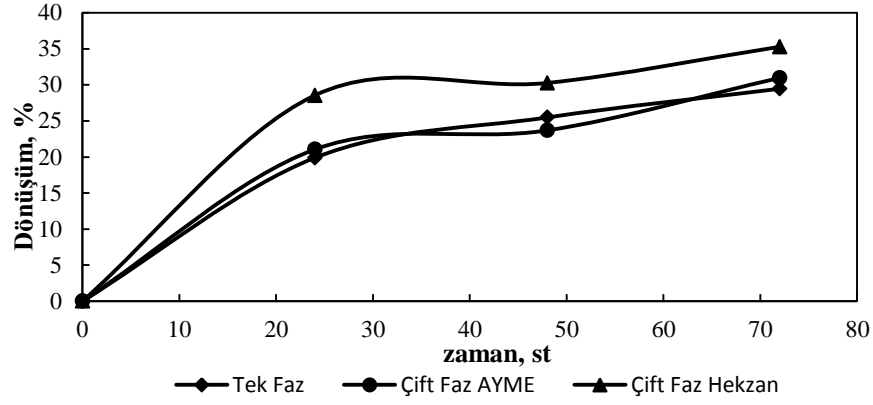
Hidrofobik faz	Bileşen	
	Laktik asit, (% mol)	Etil laktat, (% mol)
Ment-OA (1:1)	64	94
Ment-DA (1:1)	68	93
A336-Dode (1:1)	67	98
A336-DA (1:2)	43	74
Gliseril trioleat	21	29
Gliseril trioktanoat	20	37
Zeytinyağı metil esteri	5	51
Ayçiçek yağı metil esteri	12	57

4.3.2 Ekstraktif reaksiyon sisteminde etil laktat üretimi

Hacimce % 10 su içeren ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında enzimatik olarak gerçekleştirilen etil laktat üretimi, reaksiyon ortamında ayçiçeği metil esteri eklenerek ekstraktif reaksiyon sisteminde incelenmiştir. Ekstraksiyon fazının organik çözücü

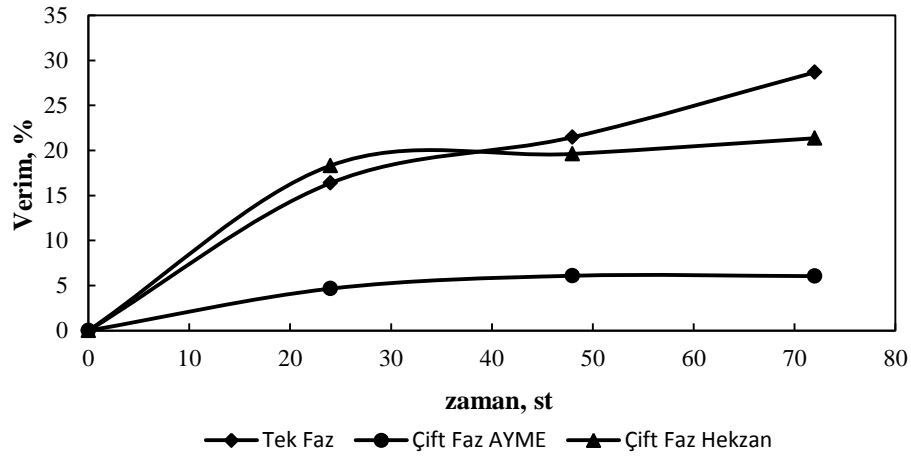
hekzan olduğu bir başka ekstraktif reaksiyon da karşılaştırma amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ekstraktif reaksiyon deneyleri, 50 °C sıcaklıkta ve 200 rpm karıştırma hızında çalkalamalı hava banyosunda izoterm koşullarda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon hacminin hidrofobik ekstraksiyon çözücü hacmine oranı (V_R/V_E) 1'dir. Ekstraktif reaksiyon toplam hacmi 20 mL ve enzim derişimi 30 mg/mL'dir. Başlangıç girdi derişimleri laktik asit ve etanol için sırasıyla 3 M ve 5 M'dir. Enzim, reaksiyon boyunca hidrofil reaksiyon fazında homojen olarak dağılmıştır. Ekstraktif reaksiyon sisteminde 24 saatte bir her iki fazdan da örnek alınmıştır. Hidrofilik reaksiyon ortamının analizi HPLC cihazında gerçekleştirilmiş; ancak hidrofobik ekstraksiyon fazının analizi yapılamamıştır.

Ekstraktif reaksiyon sistemi için hidrofil reaksiyon fazı verilerinden elde edilen laktik asit dönüşüm ve etil laktat verim sonuçları sırasıyla şekil 4.22 ve 4.23'de verilmiştir. Şekil 4.22'de tek faz (reaksiyon) ile çift faz (ekstraktif reaksiyon) sistemlerinde elde edilen dönüşümlerin birbirinden farklı olmadığı, hekzan kullanılan koşullarda ise dönüşümün tek faz sisteme göre yaklaşık % 5 arttığı görülmektedir. Şekil 4.23'de ayçiçek yağı metil esterinin çözücü olarak kullanıldığı koşullarda elde edilen verimin, hekzan ortamına ve tek faz sisteme göre daha düşük olduğu görülmektedir. Verim değerinin düşük olması, ekstraksiyon fazına etil laktat geçişinin olması ve bu nedenle analizi yapılan reaksiyon ortamında az miktarda etil laktat kalması ile açıklanabilir. Hekzanın hidrofobik faz olarak kullanıldığı çalışmada verim tek fazda elde edilen verime çok yakındır. Ayçiçek yağı metil esterine göre hekzan fazına etil laktatın daha az geçtiği görülmektedir. Ayçiçek yağı metil esterinin ve hekzanın hidrofobik ekstraksiyon fazı olarak kullanıldığı bu sistemde, tek faza göre istenen daha yüksek dönüşüm elde edilememiştir. Ancak etil laktatın hidrofobik ekstraksiyon fazı olan ayçiçek yağı metil esterine hekzana göre daha çok geçtiği görülmüştür.



Şekil 4.22 Tek faz, ayçiçek yağı metil esteri (AYME) ve hekzanın kullanıldığı çift faz sisteminde laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonu dönüşümünün zamanla değişimi

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=20$ mL, $T=50^\circ\text{C}$, $N=200$ rpm, $V_R/V_E=1$)



Şekil 4.23 Tek faz, ayçiçek yağı metil esteri (AYME) ve hekzanın kullanıldığı çift faz sisteminde laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonu veriminin zamanla değişimi

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=20$ mL, $T=50^\circ\text{C}$, $N=200$ rpm, $V_R/V_E=1$)

Etil laktat üretimini sülfirik asit, Amberlyst 15 ve $K_{2.5}H_{0.5}PW_{12}O_{40}$ katalizörlüğünde ekstraktif reaksiyon sisteminde gerçekleştiren Vu vd. (2013), ekstraksiyon çözücüsü olarak kanola yağı metil esteri kullanmışlardır. Çalışmada, tek faza göre çift fazdaki etil laktat verimi yaklaşık % 60'dan yaklaşık % 80'e artmıştır. Bu yüksek lisans çalışması ile benzer şekilde etil laktatın hidrofobik faza ekstrakte olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ

Bu yüksek lisans çalışmasında laktik asitten etil laktat üretimi Novozym 435 lipaz enzimi katalizörlüğündeki esterleşme tepkimesi ile yeni nesil çözücülerden derin ötektik çözücüler (DES) varlığında incelenmiştir. Çalışmanın birinci bölümünde, enzimatik esterleşme tepkimesinde hidrofil bir DES kullanılarak biyoproses parametrelerinin başlangıç reaksiyon hızı, dönüşüm ve verime etkileri incelenmiştir. İkinci bölümde ise enzimatik esterleşme reaksiyonu ile etil laktat üretiminde ekstraktif reaksiyon sisteminin kullanımı araştırılmıştır. Ekstraktif reaksiyon sisteminde, oluşan etil laktatın reaksiyon ortamından hidrofob ekstraksiyon fazına geçmesi ve böylece denge kısıtlanmalı tersinir reaksiyon için dönüşümün artırılması amaçlanmıştır. İlk bölümdeki yeşil kimya teknolojisinin sürdürülmesi amacıyla bu bölümde ekstraksiyon fazı olarak hidrofobik derin ötektik çözücüler ve biyoçözücüler kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk bölümünde, DES türü, DES'in su içeriği, başlangıç girdi derişimleri, enzim derişimi, sıcaklık ve karıştırma hızının; başlangıç reaksiyon hızı, dönüşüm ve verime etkileri incelenmiştir. Laboratuvarda hazırlanan ChCl-Glu (1:1), ChCl-Glu (5:2), ChCl-Fru (1:1), ChCl-Suk (1:1), ChCl-Malt (4:1), ChCl-Xyl (2:1), ChCl-Xyl (3:1), ChCl-Ga (5:2), ChCl-Gly (1:2), ChCl-Gly (1:1), ChCl-Gly (3:2), ChCl-Üre (1:2), ChCl-EG (1:2), Fru-Suk (1:1) ve Pro-Glu (5:3) DES'leri arasından ChCl-Gly (1:2), bu ortamda yüksek reaksiyon hızı elde edilmesi, kolay hazırlanabilir olması ve biyodizel üretim prosesi atığı olan gliserolün değerlendirilebilmesi nedeniyle reaksiyon çözücüsü olarak seçilmiştir. Hazırlanan ChCl-Gly (1:2) için yoğunluk, elektriksel iletkenlik ve viskozite değerleri sırasıyla 1.181 g/mL, 1.189 mS/cm ve 351 cP bulunmuştur ve bu değerler literatür ile uyumludur.

Enzimatik tepkimelerde kullanılan çözücülerin enzimi aktive veya inhibe etmelerinin söz konusu olması nedeniyle ChCl-Gly (1:2)'de Novozyme 435 lipaz aktivitesine bakılmış ve bu DES varlığında aktivitenin yaklaşık üç kat arttığı belirlenmiştir. Buna karşın, reaksiyon ortamında enzim aktivitesi düşmektedir. Bunun sebebi, reaksiyon girdileri laktik asit ve etanolün enzim aktivitesini inhibe etmesidir. Ancak ortamda bulunan ChCl-Gly (1:2)'ün özellikle laktik asitin inhibisyon etkisi azalttığı

belirlenmiştir. Bu nedenle, çözücüsüz ortam yerine DES kullanılarak daha yüksek enzim aktivitesinde çalışılması hedeflenmiştir. Benzer şekilde yapılan karşılaştırma deneylerinde organik çözücü t-bütanolde lipaz aktivitesinin yaklaşık iki kat arttığı, ancak laktik asit ve etanol içeren t-bütanol ortamında azaldığı görülmüştür.

Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için yapılarına bağlı az miktarda suya ihtiyaçları vardır. Bu nedenle, öncelikle DES ortamında gerçekleştirilen tepkimelerde başlangıçta ortama eklenecek su miktarının etkisi araştırılmıştır. Ancak esterleşme tepkimelerinde bir ürünün de su olması nedeniyle ortamın su içeriği reaksiyon hızını önemli oranda etkilemektedir (Ülger ve Takaç 2017). DES:su ikili karışımındaki su içeriğinin % 20'ye çıkarılması ile etil laktat üretimi neredeyse gerçekleşmemiştir. Hazırlanan DES ortamındaki su içeriği için en uygun değer % 10 (h/h) bulunmuştur.

Reaksiyon girdileri laktik asit ve etanol için optimum değerler sırasıyla 3 M ve 5 M bulunmuştur. Laktik asitin asitliğinin yüksek olması nedeniyle reaksiyon, enzim katalizörlüğünün yanı sıra otokatalitik olarak da gerçekleşmektedir. Bu nedenle laktik asit derişimi artması ile reaksiyon hızı artmıştır. Çalışılan derişim aralığında (0.5-3 M) laktik asit inhibisyonu görülmemiştir. Etanol derişiminin artması ile (3-6 M) ise reaksiyon hızında biraz da olsa düşme olmuştur; yüksek derişimde (6 M) etanol inhibisyonu gözlenmiştir.

Enzimatik tepkimelerde enzim derişiminin artması ile reaksiyon hızı artmakta ancak yüksek derişimlerde substrat ile doygunluğa eriştiği için artış sürmemektedir. İncelenen tepkimede, başlangıç reaksiyon hızının 30 mg/mL enzim derişiminden sonra önemli bir derişim göstermediği görülmüştür.

Reaksiyon hızını etkileyen en önemli parametrelerden biri olan sıcaklığının esterleşme hızına etkisi 50 °C'ye kadar artış sonrasında azalma şeklinde olmuştur. Biyokatalizör lipazın protein yapısının 50-60°C'den sonra bozunması nedeniyle (<https://www.strem.com> 2018f) bu şekilde bir derişim elde edilmiştir.

Laktik asitin etanol ile enzimatik esterleşme reaksiyonunda incelenen bir diğer parametre karıştırma hızıdır. Karıştırma hızı artması ile konvektif kütle aktarım kısıtlamalarının önüne geçilmesi nedeniyle reaksiyon hızında artış beklenen durumdur. Çalışmada da karıştırma hızının artması ile reaksiyon hızı artmış ve 200 rpm değerinde çalışılması uygun bulunmuştur.

ChCl-Gly (1:2) ortamında gerçekleştirilen enzimatik esterleşme reaksiyonunda dış yayılım ve iç yayılım etkileri incelenmiştir. Çalışılan 200 rpm karıştırma hızında dış yayılım direnci olmadığı belirlenmiştir. İç yayılım etkisi ise enzim derişimi ile başlangıç reaksiyon hızındaki değişim izlenerek ve Gözlenen Thiele Modülü hesaplanarak incelenmiş ve çalışma koşullarında iç yayılım direnci de görülmemiştir.

Tepkime kinetiğinin çift substratlı esterleşme ve transesterleşme tepkimeleri için geçerli olan Ping-Pong Bi-Bi mekanizmasına uyduğu varsayılmıştır. Kinetik model olarak - etanolün substrat inhibisyonuna neden olduğu deneysel olarak belirlendiği için- tek substrat inhibisyonlu Ping-Pong Bi-Bi modeli önerilmiş ve kinetik model katsayıları belirlenmiştir. Tepkime için sıcaklık ile başlangıç reaksiyon hızı değişimi verileri kullanarak aktivasyon enerjisi 43.28 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, Novozym 435 biyokatalizörlüğünde ChCl:Gly (1:2) ortamında etil alkat üretiminde en uygun olduğu belirlenen koşullarda (DES su içeriği %10, laktik asit ve etanol derişimleri sırasıyla 3 ve 5 M, enzim derişimi 30 mg/ml, sıcaklık 50 °C ve karıştırma hızı 200 rpm) elde edilen başlangıç reaksiyon hızı 13.81 µmol/gdk, dönüşüm % 29.47 ve verim % 28.68'dir.

Literatürde etil laktat üretimi üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen dönüşüm değerleri geniş bir aralıkta değişmektedir. Amberlyst 15 katalizörlüğünde çözücüsüz ortamda gerçekleştirilen çalışmalardan birinde % 25 (Zhang vd. 2004) ve % 35 (Delgado vd. 2007) dönüşüme ulaşılırken bir başka çalışmada % 80 (Asthana vd. 2006) dönüşüm elde edilmiştir. Çözücüsüz ortamda Amberlyst 15 katalizörlüğünde membran reaktörde gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonunda ise % 80-100 (Tanaka vd. 2002, Delgado vd. 2010) arasında dönüşüm elde edilmiştir. Lipaz enziminin katalizör olarak

kullanıldığı ve t-bütanol ortamında gerçekleştirilen iki çalışmada Huang vd. (2009) % 77.1, Sun vd. (2010) % 24.12 etil laktat verimine ulaşmışlardır. Bu çalışmada ise, lipaz enzimi katalizörlüğünde derin ötektik çözücü ortamında elde edilen dönüşüm ve verim değerleri % 29.48 ve % 28.68'dir. Literatürde, laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonu sonucu etil laktat üretimi için denge dönüşümü $\ln(K) = 2.9625 - 515.13/T(K)$ eşitliği ile tanımlanmıştır (Pereira vd. 2011). Buna göre 50 °C sıcaklıkta denge dönüşümü % 74'dür. Çalışmada denge dönüşümüne ulaşamamış olsa da literatür ile kıyaslandığında elde edilen sonuçlar umut vadedicidir ve iyileştirilebilir.

Termodinamik denge kısıtlaması olan laktik asitin etanol ile esterleşme tepkimesinde denge dönüşümü aşılmak istenmektedir. Literatürde ve endüstride denge dönüşümünün aşılması için reaktif distilasyon, ekstraktif reaksiyon ve membran reaktör sistemleri gibi hibrit sistemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, fazla enerji gereksinimi ve maliyeti nedeniyle tercih edilmeyen reaktif distilasyon ve membran reaktörlerle alternatif olarak ekstraktif reaksiyon sistemi ile etil laktat üretimi de denenmiştir.

Ekstraksiyon fazı olarak kullanılacak çözücü, hidrofob DES'ler ve biyoçözücüler arasından, ürün etil laktatın çözündüğü ancak girdilerin çözünmediği bir çözücü araştırılarak seçilmeye çalışılmıştır. İncelenen hidrofob çözücüler arasından ayçiçek yağı metil ester, laktik asiti de ekstrakte etmesine karşın etil laktatı en fazla ekstrakte ettiği için ekstraktif reaksiyonda (iki fazlı sistem) kullanılmıştır. Reaksiyon süresince etil laktatın ayçiçek yağı metil esterine fazına geçtiği görülmüş; ancak ekstraktif reaksiyon ile tek fazda ulaşılan dönüşüm değerinin üzerine çıkılamamıştır. Ekstraksiyon fazı olarak karşılaştırma amacıyla organik çözücü hekzan da denenmiş; ancak hekzanın yeşil çözücü ayçiçek yağı metil esterine göre önemli bir üstünlüğü görülmemiştir. Her iki çözücü kullanıldığında da karşılaşılan problem, reaksiyon süresince girdi etanolün hidrofobik ekstraksiyon fazına yavaş da olsa geçişidir.

Ekstraktif reaksiyon sisteminde reaksiyonlar tek bir koşulda gerçekleştirilmiştir. Daha iyi sonuçlar elde edilebilmesi için ekstraksiyon koşullarının geliştirilmesi gerekmektedir. Ekstraktif reaksiyon sisteminde daha uygun bir ekstraksiyon çözücüsü bulunması, ekstraksiyon fazı hacminin değiştirilmesi, uygun bir reaktörde karıştırma

hızının artırılması gibi parametreler ile ekstraksiyon hızı arttırılabilir. Bu çalışmada, ekstraktif reaksiyon için ön bulgular elde edilmiştir. Ekstraksiyon hızının reaksiyon hızından yüksek olduğu koşulların bulunması ile istenilen daha yüksek dönüşümlere ulaşılabilecektir.

Gerçekleştirilen yüksek lisans çalışmasında, son yıllarda enzimatik tepkimelerde organik çözücülere alternatif olarak önerilen derin ötektik çözücülerin etil laktat üretiminde kullanımı araştırılmıştır. Kullanım alanı giderek artan ve yeşil çözücü sınıfına dahil etil laktat üretiminin yeşil prosesler uygulanarak gerçekleştirilmesi önemlidir. Etil laktat üretiminin lipaz katalizörlüğünde ve derin ötektik çözücü ortamında gerçekleştirildiği çalışmada, dönüşüm ve verimin arttırılması, tepkime süresinin kısaltılması ve büyük ölçekli üretimin gerçekleştirilmesi için ileri çalışmalar gerekmektedir. Ekstraktif reaksiyon ile yapılan ön çalışmalar geliştirilerek büyük ölçekli ekstraktif reaktör tasarımı önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbott, A.P., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K. and Tambyrajah, V. 2003. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, (1); 70-71.
- Abbott, A.P., Harris, R.C., Ryder, K.S., D'Agostino, C., Gladden, L.F. and Mantle, M. D. 2011. Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. *Green Chemistry*, 13(1); 82-90.
- Aguieiras, E.C., Ribeiro, D.S., Couteiro, P.P., Bastos, C.M., de Queiroz, D.S., Parreira, J. M. and Langone, M. A. 2016. Investigation of the reuse of immobilized lipases in biodiesel synthesis: influence of different solvents in lipase activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(3); 485-496.
- Anonymous. 2015. Novozym. Web Sitesi: <http://www.novozymes.com/>, Erişim Tarihi:19.07.2018
- Anonymous. 2018a. PubChem. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702>, Erişim Tarihi: 11.04.2018.
- Anonymous. 2018b. PubChem. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/92831>, Erişim Tarihi: 11.04.2018.
- Anonymous. 2018c. PubChem. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/962>, Erişim Tarihi: 11.04.2018.
- Anonymous. 2018d. Agilent. Web Sitesi: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-0761EN.pdf>, Erişim Tarihi: 13.04.2018
- Anonymous. 2018e. PubChem. Web Sitesi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/612>, Erişim Tarihi: 11.04.2018.
- Anonymous. 2018f. Strem. Web Sitesi: https://www.strem.com/uploads/technical_notes/06-3123tech.pdf, Erişim Tarihi:19.07.2018.
- Aparicio, S. and Alcalde, R. 2009a. Insights into the ethyl lactate+water mixed solvent. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(43); 14257-14269.
- Aparicio, S. and Alcalde, R. 2009b. The green solvent ethyl lactate: an experimental and theoretical characterization. *Green Chemistry*, 11(1); 65-78.
- Asthana, N., Kolah, A., Vu, D.T., Lira, C.T. and Miller, D.J. 2005. A continuous reactive separation process for ethyl lactate formation. *Organic Process Research & Development*, 9(5); 599-607.

- Asthana, N.S., Kolah, A.K., Vu, D.T., Lira, C.T. and Miller, D.J. 2006. A kinetic model for the esterification of lactic acid and its oligomers. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(15); 5251-5257.
- Auras, R.A., Lim, L.T., Selke, S.E. and Tsuji, H. 2011. *Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications*. John Wiley & Sons. Volume 10. Chapter 2.
- Bayón, C., Cortés, Á., Aires-Trapote, A., Civera, C. and Hernáiz, M.J. 2013. Highly efficient and regioselective enzymatic synthesis of β -(1 \rightarrow 3) galactosides in biosolvents. *RSC Advances*, 3(30); 12155-12163.
- Bélafi-Bakó, K., Badr, A.K., Nemestóthy, N., Ehrenstein, U. and Gubicza, L. 2003. Kinetics of ethyl acetate formation by lipase in organic solvent and solvent-free system. *Chemical Papers-Slovak Academy Of Sciences*, 57(4); 278-281.
- Bermejo, D.V., Mendiola, J.A., Ibáñez, E., Reglero, G. and Fornari, T. 2015. Pressurized liquid extraction of caffeine and catechins from green tea leaves using ethyl lactate, water and ethyl lactate+water mixtures. *Food and Bioproducts Processing*, 96; 106-112.
- Cao, J., Yang, M., Cao, F., Wang, J. and Su, E. 2017. Tailor-made hydrophobic deep eutectic solvents for cleaner extraction of polyprenyl acetates from *Ginkgo biloba* leaves. *Journal of Cleaner Production*, 152; 399-405.
- Capello, C., Fischer, U. and Hungerbühler, K. 2007. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9(9); 927-934.
- Chowdary, G.V. and Prapulla, S.G. 2005. Kinetic study on lipase-catalyzed esterification in organic solvents. *Indian Journal of Chemistry*, 44B; 2322-2327.
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R. and Choi, Y.H. 2013. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766; 61-68.
- D'Agostino, C., Harris, R.C., Abbott, A.P., Gladden, L.F. and Mantle, M.D. 2011. Molecular motion and ion diffusion in choline chloride based deep eutectic solvents studied by ^1H pulsed field gradient NMR spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(48); 21383-21391.
- Dalmau, E., Montesinos, J.L., Lotti, M. and Casas, C. 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 657-663

- D'Archivio, A.A., Maggi, M.A. and Ruggieri, F. 2018. Extraction of curcuminoids by using ethyl lactate and its optimisation by response surface methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 149; 89-95.
- Datta, R. and Tsai, S. P. 1998. US 5723639.
- Delgado, P., Sanz, M.T. and Beltrán, S. 2007. Kinetic study for esterification of lactic acid with ethanol and hydrolysis of ethyl lactate using an ion-exchange resin catalyst. *Chemical Engineering Journal*, 126(2); 111-118.
- Delgado, P., Sanz, M.T., Beltrán, S. and Núñez, L.A. 2010. Ethyl lactate production via esterification of lactic acid with ethanol combined with pervaporation. *Chemical Engineering Journal*, 165(2); 693-700.
- Dietz, C.H., van Osch, D.J., Kroon, M.C., Sadowski, G., van Sint Annaland, M., Gallucci, F., Zubeir, L.F. and Held, C. 2017. PC-SAFT modeling of CO₂ solubilities in hydrophobic deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilibria*, 448; 94-98.
- Duan, G., Ching, C.B., Lim, E. and Ang, C.H. 1997. Kinetic study of enantioselective esterification of ketoprofen with n-propanol catalysed by an lipase in an organic medium. *Biotechnology Letters*, 19(11); 1051-1055.
- Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Piombo, G., Dubreucq, E. and Villeneuve, P. 2012. Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochemistry*, 47(12); 2081-2089.
- Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Dubreucq, E., Lortie, R. and Villeneuve, P. 2013. Evaluation of deep eutectic solvent–water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids. *Green Chemistry*, 15(8); 2275-2282.
- Findrik, Z., Németh, G., Gubicza, L., Bélafi-Bakó, K. and Vasić-Rački, Đ. 2012. Evaluation of factors influencing the enantioselective enzymatic esterification of lactic acid in ionic liquid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(4); 625-635.
- Gao, J., Zhao, X.M., Zhou, L.Y. and Huang, Z.H. 2007. Investigation of ethyl lactate reactive distillation process. *Chemical Engineering Research and Design*, 85(4); 525-529.
- Garcia, G., Aparicio, S., Ullah, R. and Atilhan, M. 2015. Deep eutectic solvents: physicochemical properties and gas separation applications. *Energy & Fuels*, 29(4); 2616-2644.
- Ge, D., Zhang, Y., Dai, Y. and Yang, S. 2018. Air- assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on a new hydrophobic deep eutectic solvent for the

- preconcentration of benzophenone- type UV filters from aqueous samples. *Journal of Separation Science*, 41(7); 1635-1643.
- Golmakani, M.T., Rezaei, K., Mazidi, S. and Razavi, S.H. 2012. γ - Linolenic acid production by *Arthrospira platensis* using different carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(3); 306-314.
- Gorke, J.T., Srienc, F. and Kazlauskas, R.J. 2010. Deep eutectic solvents for *Candida antarctica* lipase B-catalyzed reactions. In *Ionic Liquid Applications: Pharmaceuticals, Therapeutics, and Biotechnology*. American Chemical Society. (169-180); Washington.
- Gu, Y. and Jérôme, F. 2013. Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry. *Chemical Society Reviews*, 42(24); 9550-9570.
- Hernaiz, M.J., Alcantara, A.R., Garcia, J.I. and Sinisterra, J.V. 2010. Applied biotransformations in green solvents. *Chemistry-A European Journal*, 16(31); 9422-9437.
- Huang, Z., Gao, J., Zhao, T., Li, W., Zhou, L. and He, Y. 2009. Lipase catalyzed synthesis of ethyl lactate. In *Bioinformatics and Biomedical Engineering. ICBBE. 2009. 3rd International Conference* (1-4).
- José, C., Bonetto, R.D., Gambaro, L.A., Torres, M.D.P.G., Foresti, M.L., Ferreira, M.L. and Briand, L.E. 2011. Investigation of the causes of deactivation–degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol–aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(3-4); 95-107.
- Juneidi, I., Hayyan, M., Hashim, M.A. and Hayyan, A. 2017. Pure and aqueous deep eutectic solvents for a lipase-catalysed hydrolysis reaction. *Biochemical Engineering Journal*, 117; 129-138.
- Kachasakul, P., Assabumrungrat, S., Prasertdam, P. and Pancharoen, U. 2003. Extractive reaction for epoxidation of cyclohexene to cyclohexene oxide using dioxirane in ketone/Oxone® system. *Chemical Engineering Journal*, 92(1-3); 131-139.
- Kamalanathan, I., Canal, L., Hegarty, J. and Najdanovic-Visak, V. 2018. Partitioning of amino acids in the novel biphasic systems based on environmentally friendly ethyl lactate. *Fluid Phase Equilibria*, 462; 6-13.
- Keskin, S., Kayrak-Talay, D., Akman, U. and Hortaçsu, Ö. 2007. A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 43(1); 150-180.

- Komesu A., Jaimes Figueroa J., Rios L., Martins P., Lunelli B., Oliveira J., Maciel Filho R. and Wolf Maciel M.R. 2015. Evaluation of operational parameters for ethyl lactate production using reactive distillation process. *Chemical Engineering Transactions*, 43; 1141-1146.
- Krause, P., Macias, R. and Fieg, G. 2010. Applicability of a countercurrent enzymatically catalyzed multistage extractive reaction process for the hydrolysis of methyl octanoate. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(7); 3217-3222.
- Leron, R.B. and Li, M.H. 2012. High-pressure volumetric properties of choline chloride–ethylene glycol based deep eutectic solvent and its mixtures with water. *Thermochimica Acta*, 546; 54-60.
- Martino-Gauchi, G. and Teissier, R. 2007. US 7297809.
- Major, B., Németh, G., Bélafi-Bakó, K. and Gubicza, L. 2010. Unique role of water content in enzymatic synthesis of ethyl lactate using ionic liquid as solvent. *Chemical Papers*, 64(2); 261-264.
- McConville, J.T. , Carvalho, T.C. , Kucera, S. A. and Garza, E. 2009. Ethyl Lactate as a Pharmaceutical-Grade Excipient And Development of a Sensitive Peroxide Assay. *Pharmaceutical Technology*, 33(5); 74.
- Murakami, Y. and Hirata, A. 1997. Continuous enzymatic synthesis of aspartame precursor at low pH using an extractive reaction. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(3); 264-267.
- Muse Jr, J. and Colvin, H.A. 2011. US 8048919.
- Nikles, S.M., Piao, M., Lane, A.M. and Nikles, D.E. 2001. Ethyl lactate: a green solvent for magnetic tape coating. *Green Chemistry*, 3(3); 109-113.
- Oliveira, F.S., Pereiro, A.B., Rebelo, L.P. and Marrucho, I.M. 2013. Deep eutectic solvents as extraction media for azeotropic mixtures. *Green Chemistry*, 15(5); 1326-1330.
- van Osch, D.J., Parmentier, D., Dietz, C.H., van den Bruinhorst, A., Tuinier, R. and Kroon, M. C. 2016. Removal of alkali and transition metal ions from water with hydrophobic deep eutectic solvents. *Chemical Communications*, 52(80); 11987-11990.
- van Osch, D.J., Zubeir, L.F., van den Bruinhorst, A., Rocha, M.A. and Kroon, M.C. 2015. Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chemistry*, 17(9); 4518-4521.

- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L. and Duarte, A.R.C. 2014. Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5); 1063-1071.
- Pereira, C.S., Pinho, S.P., Silva, V.M. and Rodrigues, A.E. 2008. Thermodynamic equilibrium and reaction kinetics for the esterification of lactic acid with ethanol catalyzed by acid ion-exchange resin. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(5); 1453-1463.
- Pereira, C.S., Zabka, M., Silva, V.M. and Rodrigues, A.E. 2009a. A novel process for the ethyl lactate synthesis in a simulated moving bed reactor (SMBR). *Chemical Engineering Science*, 64(14), 3301-3310.
- Pereira, C.S., Silva, V.M. and Rodrigues, A.E. 2009b. Fixed bed adsorptive reactor for ethyl lactate synthesis: experiments, modelling, and simulation. *Separation Science and Technology*, 44(12); 2721-2749.
- Pereira, C.S., Silva, V.M. and Rodrigues, A.E. 2011. Ethyl Lactate as a Solvent: Properties, Applications and Production Processes. *Green Chemistry*, 13; 2658-2671.
- Samant, K.D. and Ng, K.M. 1998. Design of multistage extractive reaction processes. *AIChE Journal*, 44(12); 2689-2702.
- Segel, I.H. 1975. *Enzyme Kinetics: Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. John Wiley&Sons, Inc, 992, New York.
- Shahbaz, K., Mjalli, F.S., Hashim, M.A. and Al-Nashef, I.M. 2010. Using deep eutectic solvents for the removal of glycerol from palm oil-based biodiesel. *Journal of Applied Sciences*, 10(24); 3349-3354.
- Shaw, W.H.R. 1957. The Kinetics of Enzyme Catalyzed Reactions. *Journal of Chemical Education*, 34(1); 22-25.
- Smith, E.L., Abbott, A.P. and Ryder, K.S. 2014. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical Reviews*, 114(21); 11060-11082.
- Stergiou, P.Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L.G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A. and Papamichael, E. M. 2013. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology Advances*, 31(8); 1846-1859.
- Sun, J., Jiang, Y., Zhou, L. and Gao, J. 2010. Optimization and kinetic study of immobilized lipase-catalyzed synthesis of ethyl lactate. *Biocatalysis and Biotransformation*, 28(4); 279-287.

- Tanaka, K., Yoshikawa, R., Ying, C., Kita, H. and Okamoto, K. I. 2002. Application of zeolite T membrane to vapor-permeation-aided esterification of lactic acid with ethanol. *Chemical Engineering Science*, 57(9); 1577-1584.
- Teerachaiyapat, T. and Ramakul, P. 2016. Application of hollow fiber supported liquid membrane as a chemical reactor for esterification of lactic acid and ethanol to ethyl lactate. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 33(1); 8-13.
- Tretjak, S., Burtin, E. and Teissier, R. 2003. US 10/537422.
- Ülger, C. and Takaç, S. 2017. Kinetics of lipase-catalysed methyl gallate production in the presence of deep eutectic solvent. *Biocatalysis and Biotransformation*, 35(6); 407-416.
- Ülger, C. 2016. Gallik Asit Esterlerinin Lipaz Enzimi İle Üretim Parametrelerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ünlü, A.E., Prasad, B., Anavekar, K., Bubenheim, P. and Liese, A. 2017. Investigation of a Green Process for the Polymerization of Catechin. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(9);s 918-924.
- Villanueva-Bermejo, D., Reglero, G. and Fornari, T. 2017. Recent advances in the processing of green tea biomolecules using ethyl lactate. A review. *Trends in Food Science & Technology*, 62; 1-12.
- Vu, D.T., Kolah, A.K., Asthana, N.S., Peereboom, L., Lira, C.T. and Miller, D.J. 2005. Oligomer distribution in concentrated lactic acid solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 236(1); 125-135.
- Vu, T.H.T., Au, H.T., Nguyen, T.H.T., Nguyen, T.T.T., Do, M.H., Bui, N.Q. and Essayem, N. 2013. Esterification of lactic acid by catalytic extractive reaction: an efficient way to produce a biosolvent composition. *Catalysis Letters*, 143(9); 950-956.
- Wang, Y., Jiang, Y., Zhou, L. and Gao, J. 2010. Enzymatic Esterification of Ammonium Lactate with Ethanol in Organic Solvent: Kinetic Study. In *Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE)*. 4th International Conference on (1-4).
- Wasewar, K., Patidar, S. and Agarwal, V.K. 2009. Esterification of lactic acid with ethanol in a pervaporation reactor: modeling and performance study. *Desalination*, 243(1); 305-313.
- Wildes, S. 2002. Methyl soyate: A new green alternative solvent. *Chemical Health and Safety*, 24-26.

- Yadav, G.D. and Devi, K.M. 2001. A kinetic model for the enzyme-catalyzed self-epoxidation of oleic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(4); 347-351.
- Zhan, H., Jiang, Y., Wang, B., Zhu, K. and Zhao, B. 2012. Study on removal efficiencies and mechanism of heavy metal from sewage-irrigated soils by saponin compared with commonly used washing agents. *International Journal of Engineering Science*, 3; 461-469.
- Zhang, Y., Ma, L. and Yang, J. 2004. Kinetics of esterification of lactic acid with ethanol catalyzed by cation-exchange resins. *Reactive and Functional Polymers*, 61(1); 101-114.
- Zhang, Q., Vigier, K.D.O., Royer, S. and Jérôme, F. 2012. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21); 7108-7146.
- Zhao, T., Zhang, L., Gao, J., Huang, Z. and Quan, X. 2008. Reaction Kinetics of Ethyl Lactate Synthesis from Lactic Acid and Ethanol Catalyzed by Lipase. *Chinese Journal of Catalysis*, 2.

EKLER

EK 1 Çalışmada kullanılan cihaz ve modelleri

EK 2 Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyokimyasal maddeler

EK 3 Laktik asit, etil laktat ve oligomerlerinin HPLC kromotogramları

EK 4 Reaksiyon Ortamının HPLC Kromotogramı

EK 5 Laktik Asit ve Etil Laktatın Kantitatif HPLC Analizleri

EK 6 HPLC Analizlerinin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

EK 7 En Uygun Koşullarda Gerçekleştirilen Laktik Asitin Etanol ile Lipaz Katalizli Esterleşme Reaksiyonunun Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

EK 1 Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Modelleri

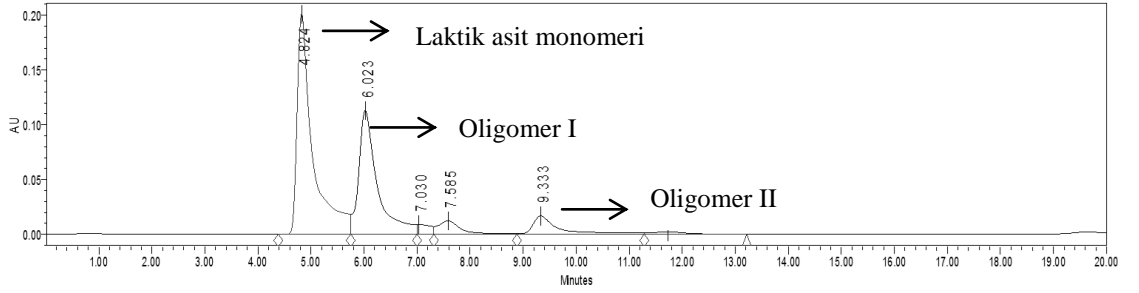
Cihaz	Model
Çalkalamalı hava banyosu	Edmund Bühler TH 30, Shel Lab S16R2
HPLC cihazı	Waters Alliance 2695
İletkenlik cihazı	Radiometer Ioncheck65
pH metre	Sartorius PP25
PVDF membran	Millipore Durapore
Saf su cihazı	Millipore MilliQ Gradient
Süzme düzeneği	Millipore
Terazi	Mettler Toledo
Ultrasonik banyo	Elma S 30 H
Viskozimetre	Fungilab Smart Series

EK 2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

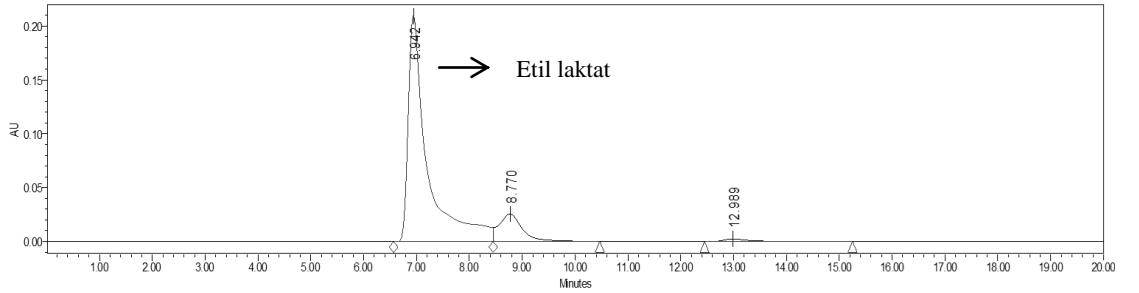
Kimyasal	Firma	Katalog No
Aliquat 336	Sigma Aldrich	205613
Asetonitril	Sigma Aldrich	1.000.302.500
<i>t</i> -Bütanol	Merck	1.096.290.500
Dekanoik asit	Sigma Aldrich	C1875
1-Dodekanol	Sigma Aldrich	126799
Etanol	Isolab	9.200.262.500
Etil laktat	Aldrich	E34102
Etilen glikol	Merck	1.009.492.500
<i>o</i> -Fosforik asit	Riedel de Haen	4107
D(-)-Fruktoz	Merck	104.007
D(+)-Galaktoz	Merck	104.062
Gliseril trioktanoat	Sigma Aldrich	9126
Gliseril trioleat	Sigma Aldrich	7752
Gliserol	Sigma Aldrich	G5516
D(+)-Glukoz	Applichem	A3666
Hekzan	Merck	1.043.912.500
Kolin klorür	Sigma	C1879
D(+)-Ksiloz	Merck	10.868.901
L-Laktik asit	Sigma Aldrich	27714
Lidokain	Sigma Aldrich	L7757
Maltoz	Merck	1.0591
DL-Mentol	Sigma Aldrich	W266507
Metanol	Merck	1.060.072.500
Oktanoik asit	Sigma Aldrich	C2875
Palmitik asit	Sigma Aldrich	P5585
Potasyum hidroksit	Merck	105012
L-Proline	Sigma	P0380
Sitrik asit	Merck	1.002.425.000
D(+)-Sukroz	Applichem	A2211
Üre	Merck	1.084.871.000

EK 3 Laktik Asit, Etil Laktat ve Oligomerlerinin HPLC Kromotogramları

Esterleşme tepkimesindeki girdi laktik asit ve ürün etil laktat ile oligomerlerinin kalitatif analizi, Bölüm 3.2.4.1’de yer alan çizelge 3.4’deki koşullarda HPLC cihazında yapılmıştır. Laktik asit ve molekül ağırlıklarına göre tahmin edilen laktik asit oligomerleri ile etil laktata ait HPLC kromotogramları sırasıyla şekil 1-2’de verilmiştir.



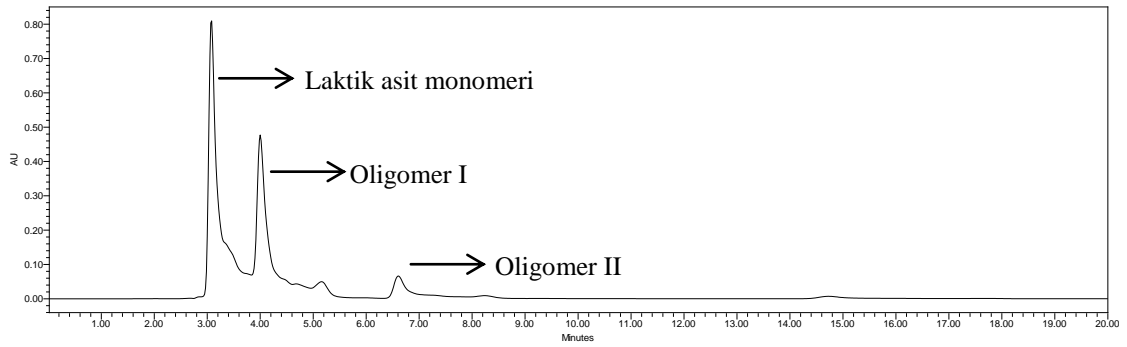
Şekil 1 Laktik asit için yapılan kalitatif analizin HPLC kromotogramı



Şekil 2 Etil laktat için yapılan kalitatif analizin HPLC kromotogramı

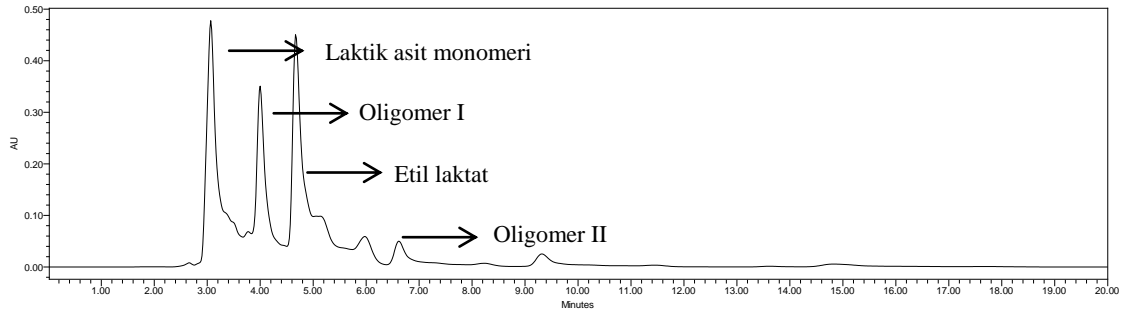
EK 4 Reaksiyon Ortamının HPLC Kromotogramı

Laktik asitin etanol ile esterleşme reaksiyonunun lipaz enzimi katalizörlüğünde ve ChCl-Gly (1:2):su (% 10 (h/h)) ikili karışımındaki reaksiyon ortamının t=0 ve 72. saat örneklerine ait HPLC kromotogramları sırasıyla şekil 1-2’de verilmiştir. Tepkime başlamadan ortamda yalnızca laktik asit ve oligomerlerinin olduğu, 72 saat sonunda etil laktat oluştuğu gösteren pik görülmektedir.



Şekil 1 ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında laktik asitin etanol ile lipaz enzimi katalizli esterleşme tepkimesinin t=0 saat örneğine ait HPLC kromotogramı

($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=10$ mL, $T=50$ °C)

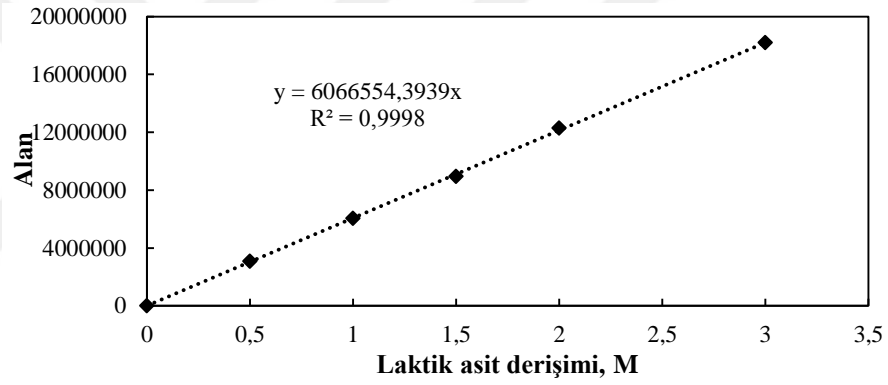


Şekil 2 ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında laktik asitin etanol ile lipaz enzimi katalizli esterleşme tepkimesinin t=72 saat örneğine ait HPLC kromotogramı

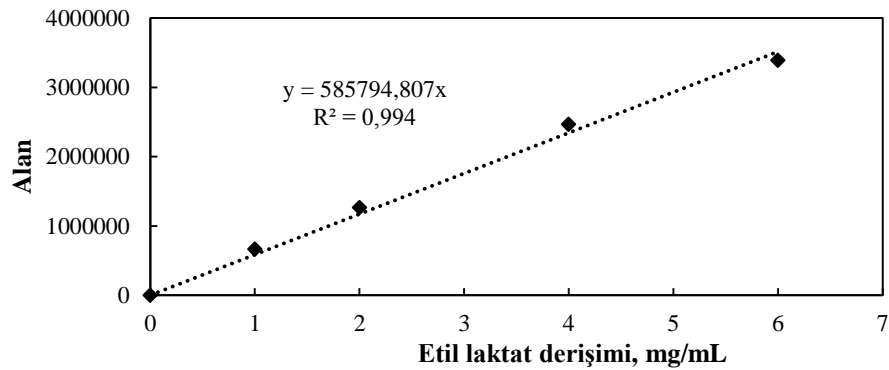
($C_{A0}=3$ M, $C_{B0}=5$ M, $C_{E0}=30$ mg/mL, $V_T=10$ mL, $T=50$ °C)

EK 5 Laktik Asit ve Etil Laktatın Kantitatif HPLC Analizleri

HPLC cihazında yapılan analizler sonucunda laktik asit ve etil laktata ait pik alanlarından derişim değerlerine geçmek amacı ile şekil 1-2’de verilen kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır. ChCl-Gly (1:2):su ikili karışımında farklı derişimlerde hazırlanan laktik asit (0.5-3.0 mol/L) ve etil laktat (1.0-6.0 mg/mL) Bölüm 3.2.4.1’de yer alan çizelge 3.2’deki HPLC koşullarında analiz edilmiştir. Her örnek derişimine karşı analizlerde HPLC analizinde elde edilen pik alanları grafiğe geçirilmiş ve noktalara uyan doğru çizilmiştir. Doğruların eğimi, HPLC analizlerinde elde edilen pik alanlarından laktik asit ve etil laktatın reaksiyon ortamındaki derişim değerlerine geçmek için kullanılmıştır.



Şekil 1 ChCl-Gly (1:2) DES’inde laktik asitin kantitatif HPLC analizi için kullanılan kalibrasyon grafiği



Şekil 2 ChCl-Gly (1:2) DES’inde etil laktatın kantitatif HPLC analizi için kullanılan kalibrasyon grafiği

EK 6 HPLC Analizlerinin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

HPLC’de gerçekleştirilen kantitatif analizlerin doğruluğunun ve tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla laktik asit ve etil laktat çözeltileri (ChCl-Gly (1:2)’de) HPLC’de 5 kez analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen piklerin alanlarından laktik asit ve etil laktat için standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Standart sapma değerleri Eşitlik 6.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - x_{ort})^2}{n-1}}$$

6-1

Burada;

S	Standart sapma
x_i	Örneğe ait değer
x_{ort}	Örneklere ait ortalama değer
n	Örnek sayısı

dır.

Çizelge EK 6.1 ve 6.2’de sırasıyla laktik asit ve etil laktat örneklerine ait alan değerleri, ortalama değerleri ve farklarının karesi verilmiştir. Standart sapma değerleri laktik asit ve etil laktat için sırasıyla 15998.1 ve 32206.6 olarak hesaplanmıştır. Standart sapma değerleri, pik alanlarının ortalamasının sırasıyla % 0.28 ve 0.66’sına karşılık gelmektedir.

Çizelge 1 Kantitatif HPLC analizinde laktik asite ait standart sapma hesabında kullanılan veriler

x_i	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
5747456	7105.4	50486709.16
5761283	20932.4	438165369.8
5744448	4097.4	16788686.76
5725279	-15071.6	227153126.6
5723287	-17063.6	291166445

Çizelge 2 Kantitatif HPLC analizinde etil laktata ait standart sapma hesabında kullanılan veriler

x_i	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
4800713	-48364.6	2339134533
4835078	-13999.6	195988800
4856756	7678.4	58957826.6
4870956	21878.4	478664387
4881885	32807.4	1076325495



EK 7 En Uygun Koşullarda Gerçekleştirilen Laktik Asitin Etanol ile Lipaz Katalizli Esterleşme Reaksiyonunun Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

ChCl-Gly (1:2): su ikili karışımında laktik asitin etanol ile Novozym 435 lipaz enzimi katalizli esterleşme reaksiyonunun doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini belirlemek için, en uygun koşullarda 3 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen dönüşüm değerlerinin standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 1'deki veriler ile standart sapma değeri 1.89 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, dönüşümlerin ortalama değerinin % 6.85'ine karşılık gelmektedir.

Çizelge 1 En uygun koşullardaki esterleşme reaksiyonunun 72 saat sonunda elde edilen dönüşüm verilerinin standart sapma hesabında kullanılan verileri

x_i	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
29.47	1.8448	3.4033
25.69	-1.9362	3.7489
27.71	0.0914	0.0084

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Azime ARIKAYA
Doğum Yeri : Altıntaş/KÜTAHYA
Doğum Tarihi : 29.08.1992
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce, Korece

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kılıçarslan Anadolu Lisesi (2010)
Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği
Bölümü (2015)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği
Anabilim Dalı (Ocak 2016 – Temmuz 2018)

Çalıştığı Kurum ve Yıl

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü - Araştırma Görevlisi (2018-halen)

Uluslararası Kongre Sunumu

Poster sunumu:

1. **Arıkaya, A.**, Ünlü, A. E., Takaç, S. 2017.The effect of deep eutectic solvent on lipase catalyzed esterification. ANCON-Material and Chemistry Science, Ankara, Türkiye. 264.

Ulusal Kongre Sunumu

Poster sunumu:

1. **Arıkaya, A.**, Takaç, S. 2015. Mikrobiyal antioksidan enzimleri üretimi. AKMBB (Ankara Kimya Mühendisliği Bölümleri Birlikteliği) Proje Sergisi, Ankara, Türkiye.
2. Altan, Y., Bayrav, F., **Arıkaya, A.**, Ülger, C., Değirmenbaşı, D., Takaç, S. 2016. Kimya mühendisliğinde yeşil çözücü uygulamaları. **AKMBB** (Ankara Kimya Mühendisliği Bölümleri Birlikteliği) Proje Sergisi, Ankara, Türkiye.3