

ÖZET

FERMENTE EDİLEBİLİR BİYOKÜTLEDEN ANAEROBİK FERMANTASYONLA ELDE EDİLEN ÖNCÜ MADDELERDEN POLİHİDROKSİALKANATLARIN ÜRETİLMESİ

5

İÇİN YÖNTEM

Fermente edilebilir biyokütleden anaerobik fermentasyonla üretilen, ön madde olarak adlandırılan uçucu yağ asidi moleküllerinden (AGV) polihidroksialkanatlar veya PHA 10 üretilmesi için yöntem olup, özelliği; en az aşağıdaki aşamaları içermesiyle karakterize edilir:

a) uçucu yağ asidi (AGV) moleküllerinin, fermentasyona ara vermeksizin, fermentasyon ortamında en azından çözünmeyen 15 araçları arasından seçilen bir ekstraksiyon aracıyla ekstrakte edilmesi,

b) ekstre edildiklerinde, uçucu yağ asidi (AGV) moleküllerinin fermentasyon reaktörünün dışında toplanması,

c) b) aşamasında toplanan uçucu yağ asitleri arasından seçilen 20 ve istenen PHA türüne göre tanımlanmış olan bir uçucu yağ asidi (AGV) türünden belirli bir α -halojenli asidin halojenasyon yoluyla sentezlenmesi,

d) bu α -halojenli asitten, belirli bir α -hidroksi asidin moleküllerinin bir bazla reaksiyona sokularak sentezlenmesi,

25 e) elde edilen α -hidroksiasitten tanımlı bir polihidroksialkanat (PHA) polimerizasyonu.

İSTEMLER

1. Fermente edilebilir biyokütleden anaerobik fermentasyonla üretilen, ön madde olarak adlandırılan uçucu yağ asidi moleküllerinden (AGV) polihidroksialkanatlar veya PHA üretilmesi için yöntem **olup, özelliği**; en az aşağıdaki aşamaları içermesiyle **karakterize edilir**:
- 5 a) uçucu yağ asidi (AGV) moleküllerinin, fermentasyona ara vermeksizin, fermentasyon ortamında en azından çözünmeyen araçları arasından seçilen bir ekstraksiyon aracıyla ekstrakte edilmesi,
- 10 b) ekstre edildiklerinde, uçucu yağ asidi (AGV) moleküllerinin fermantasyon reaktörünün dışında toplanması,
- c) b) aşamasında toplanan uçucu yağ asitleri arasından seçilen ve istenen PHA türüne göre tanımlanmış olan bir uçucu yağ asidi (AGV) türünden belirli bir α -halojenli asidin halojenasyon yoluyla sentezlenmesi,
- 15 d) bu α -halojenli asitten, belirli bir α -hidroksi asidin moleküllerinin bir bazla reaksiyona sokularak sentezlenmesi,
- 20 e) elde edilen α -hidroksiasitten tanımlı bir polihidroksialkanat (PHA) polimerizasyonu.
2. İstem 1'e göre yöntem **olup, özelliği**; c) aşamasında kullanılan halojenli bileşiğin dibrom olmasıyla **karakterize edilir**.
- 25 3. İstem 1'e göre yöntem **olup, özelliği**; c) aşamasında kullanılan halojenli bileşiğin dibromdan farklı olmasıyla **karakterize edilir**.
4. İstem 1 veya 2'ye göre yöntem **olup, özelliği**; c) aşaması sırasında asetik anhidridin uçucu yağ asidine göre %12'ye yakın bir molar yüzdesinde kullanılmasıyla **karakterize edilir**.
- 30 5. İstem 1 veya 2'ye göre yöntem **olup, özelliği**; c) aşaması sırasında, halojenlenecek uçucu yağ asidine (AGV) karşılık gelen bir anhidridin kullanılmasıyla **karakterize edilir**.
6. Önceki istemlerden birine göre yöntem **olup, özelliği**; c) 35 aşaması sırasında, brominasyon reaksiyonunun

gerçekleştirildiği sıcaklığın uçucu yağ asidinin kaynama sıcaklığından 20°C ila 40°C düşük olmasıyla **karakterize edilir.**

5 7. Önceki istemlerden birine göre yöntem **olup, özelliği;** d) aşaması sırasında, kullanılan bazın soda olmasıyla **karakterize edilir.**

8. İstem 7'ye göre yöntem **olup, özelliği;** d) aşaması sırasında, sodanın α -halojenli asitle eşit mol miktarında olmasıyla **karakterize edilir.**

10 9. İstem 7 veya 8'e göre yöntem **olup, özelliği;** d) aşaması sırasında, α -halojenli asidin sodayla reaksiyonunun 20°C ile 120°C arasında, avantajlı olarak 50°C ile 90°C arasında gerçekleştirilmesiyle **karakterize edilir.**

15 10. İstem 9'a göre yöntem **olup, özelliği;** d) aşaması sırasında, α -halojenli asidin sodayla reaksiyonunun α -halojenli asidin en az dört karbonu varsa 50°C'ye yakın bir sıcaklık için ve α -halojenli asidin dörtten az karbonu varsa 90°C'ye yakın bir sıcaklık için optimum olmasıyla **karakterize edilir.**

20

TARİFNAME

FERMENTE EDİLEBİLİR BİYOKÜTLEDEN ANAEROBİK FERMANTASYONLA ELDE EDİLEN ÖNCÜ MADDELERDEN POLİHİDROKSİALKANATLARIN ÜRETİLMESİ

5 İÇİN YÖNTEM

Bu buluş, fermente edilebilir biyokütleden anaerobik fermentasyonla elde edilen ön maddelerden polihidroksialkanatların üretilmesi için bir yönteme 10 ilişkindir.

Bundan sonra, okuma kolaylığı için, polihidroksialkanatlar kısaltmalarıyla belirtilecektir: PHA. Bu aile, karbon sayısına bağlı olarak birkaç molekül içerir.

PHA'lar, bitki kökenli şekerlerden, özellikle mısır 15 nişastasından veya bitkisel atıklardan mikrobiyal fermentasyonla üretilen termoplastik polyesterlerdir. Mikroorganizmalar, aşırı karbon arzıyla ilişkili bazı metabolitlerde eksiklik koşulları oluştuğunda PHA üretir. Başka bir deyişle, mikroorganizmalar, bu durumda, şekerden 20 gelen karbonu PHA granülleri formunda toplar. PHA'lar, örneğin, ambalajlama için bir kurucu malzeme olarak veya tıbbi alanda dikiş malzemesi olarak kullanılır. Petrolden türetilen polimerlerin yerini alırlar.

PHA'ların üretilmesi için seçilmiş saf mikroorganizma 25 türlerini ve spesifik bir substratı kullanan fermentasyon yöntemleri bilinmektedir. Böyle bir çözümden kabul edilebilir bir üretim maliyeti için endüstriyel ölçekte yararlanılması zordur.

EP-A-2 749 650'den de endüstriyel kullanıma uyarlanmış bir 30 yöntem bilinmektedir. Kullanılan substrat atıklardan türetilmiştir ve PHA'ların ön maddesi olduğu bilinen uçucu yağ asitleriyle (AGV) zenginleştirilmiştir. Bir bakteri konsorsiyumu ve biyokütle ve eksiklik fazlarının değişen büyüme aşamaları kullanılarak kontrollü bir şekilde bakteri 35 üremesi ve PHA üretimi uyarılır. Bununla birlikte, böyle bir

yöntem fermantasyon koşullarının hassas bir şekilde kontrol edilmesini ve üretilen PHA'ların ekstrasyonu için nispeten ağır bir tesisatı gerektiren uyarlanmış bir işlemi gerektirir. Üstelik, bu tür bir ekstraksiyon sürekli olarak yapılamaz ve herhangi bir PHA türünün üretimine imkân vermez. Bu yöntemin diğer bir dezavantajı, özgüllüğüdür: yalnızca mikrobiyal, yani mikroorganizmalar tarafından üretilen PHA üretebilir. WO 03/062439, organik atıkları polihidroksialkanatlar (PHA'lar) içeren biyolojik olarak parçalanabilir termoplastik malzemelere dönüştürmeye yönelik bir yöntemi açıklar. Bu yöntem, uçucu organik asitler oluşturmak için organik atıkların asit üreten bir mikrobik popülasyonla işleminden geçirilmesini ve bu organik asitlerin PHA'lar oluşturmak için PHA üreten mikrobiyal türlerle polimerizasyonunu içerir.

Buluş, daha özel olarak, bu dezavantajları çeşitli PHA türlerini kolayca ve bilinen üretim şekillerinin kısıtlanması olmaksızın üretmeye imkân veren, PHA üretimi için bir yöntem önererek ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır.

Bu amaçla, buluşun konusu, en az aşağıdaki aşamaları içermesiyle karakterize edilen, fermente edilebilir biyokütleden anaerobik fermentasyonla üretilen, ön madde olarak adlandırılan uçucu yağ asidi moleküllerinden (AGV) polihidroksialkanatlar veya PHA üretilmesi için bir yöntemdir:

a) uçucu yağ asidi (AGV) moleküllerinin, fermentasyona ara vermeksizin, fermentasyon ortamında en azından çözünmeyen araçları arasından seçilen bir ekstraksiyon aracıyla ekstrakte edilmesi,

b) ekstre edildiklerinde, uçucu yağ asidi (AGV) moleküllerinin fermantasyon reaktörünün dışında toplanması,

c) b) aşamasında toplanan uçucu yağ asitleri arasından seçilen ve istenen PHA türüne göre tanımlanmış olan bir uçucu yağ asidi (AGV) türünden belirli bir α -halojenli asidin halojenasyon yoluyla sentezlenmesi,

d) bu α -halojenli asitten, belirli bir α -hidroksi asidin moleküllerinin bir bazla reaksiyona sokularak sentezlenmesi,
e) elde edilen α -hidroksiasitten tanımlı bir polihidroksialkanat (PHA) polimerizasyonu.

5

Böylece, böyle bir yöntem, fermantasyon olmadan gerçekleştirilen bir sentez fazı ile mikroorganizmalarla sürekli bir ön madde üretim fazının birleştirilmesine imkân verir, bu da üretilen polihidroksialkanat (PHA) türünde daha fazla değişkenliğe izin vererek, çeşitli parametrelerin kolayca kontrol edilmesine imkân verir.

10

Böyle bir yöntem, biyoreaktörde bulunan mikroorganizmaların üretim kapasitesini koruyarak, ön maddelerin yani uçucu yağ asitlerinden sürekli yararlanmaya imkân verir.

15

Nitekim, a) ve b) ekstraksiyon ve toplama aşamaları yalnızca fermantasyon reaktöründe üretilen uçucu yağ asidi moleküllerinin ekstrakte edilmesine ve sürekli olarak toplanmasına değil, aynı zamanda bu üretimden sorumlu olan mikroorganizmaların korunmasını da imkân verir. Nitekim, ekstraksiyon ve fiilen toplama bütün mikroorganizmalar için en azından öldürücü olmayan koşullar, yani biyo-uyumlu ekstraksiyon ve toplama koşulları altında gerçekleştirilir, yani ekstraksiyon mikroorganizmaların aktivitesini korur ve toplama fermantasyon reaktörünün dışında gerçekleşir.

20

25

Bu şekilde, fermantasyon reaktöründe metabolitlerin birikmesiyle, örneğin fermantasyon ortamının mikroorganizmalara zararlı olan uçucu yağ asitlerinin birikerek asitlenmesiyle ilgili sorunlar aşılır. Mikroorganizmaların miktarı ve aktivitesi, tüm fermantasyon döngüsü boyunca, başlangıç seviyesine yakın, yüksek bir seviyede tutulur.

30

Sürekli ve düzenli bir AGV üretiminden yararlanarak, kolayca kullanılabilir ve hızlı bir şekilde çeşitli bir ön madde kaynağına sahip olunur. Buluşun konusu olan yöntemde, bu kullanım c) aşamasından başlayarak, kimyasal sentez yoluyla ve

35

dolayısıyla kolayca kontrol edilebilir ve değiştirilebilir koşullar altında yapılır, bu aynı zamanda sentezlenen moleküllerin türündü büyük bir değişkenlik sunar. Nitekim, c) aşamasında, halojenasyonu gerçekleştirmek için seçilen AGV'ye göre, belirli bir α -halojenli asit türü ve dolayısıyla, daha sonra, tanımlanmış bir α -hidroksi asit türü ve dolayısıyla belirli bir α -PHA türü elde edilir. Buluş aynı zamanda yöntemin son aşamasında heteropolimerler üretmek için bu şekilde elde edilen birkaç α -hidroksi asidin kombinasyonuna da imkân verir.

Endüstriyel, kozmetik, tıbbi, gıda veya diğer kullanımlar için bir yarar sunan birkaç PHA türü vardır. Örnek olarak, polihidroksibütirat veya PHB, poli(3-hidroksibütirat-co3-hidroksivalerat) veya PHBV sayılabilir. PHA türleri arasında aynı zamanda, teknikte bilinen yöntemle, doğrudan bilinen bir yöntemle doğrudan PLA üretmenin mümkün olmadığını bilerek, glikol poliakid veya PGA veya poli laktik asit veya PLA üretimi sayılabilir, bu sonuncu bir laktik asit fermantasyonuyla üretimden polimerize edilmelidir.

Başka bir deyişle, buluş sayesinde, biyolojik yolla bir üretimin kimyasal yolla bir üretimle birleştirilerek biyolojik kaynaklı bir substrattan birkaç PHA türünün yani homo, ko veya heteropolimerik türlerin düzenli ve kontrollü bir şekilde sentezlenmesi gerçekleştirilebilir.

Böyle bir yöntem, anaerobik fermantasyon fazı sırasında, fermente edilebilir biyokütlenin kullanılmasına imkân verir. Fermente edilebilir biyokütleden, burada, organik maddelerden, yani evsel, endüstriyel, tarımsal, ormancılık, su ürünleri yetiştiriciliği, tarımsal-endüstriyel olsun insan aktivitelerinden türetilen, hayvan yetiştiriciliği veya başkasından türetilen biyokütleden oluşturulan atıklardan, yan ürünlerden ve eş ürünlerden elde edilen, avantajlı olarak gıda olmayan organik bir substrat anlaşılır. Sınırlayıcı olmayan örnek olarak, organik substrat olarak gübreler, ev çöplerinin organik kısmı, mezbaha eş ürünleri, şeker kamışı (küspe),

ayçiçeği veya soyanın dönüşümünden türetilenler gibi tarımsal sanayiden elde edilen selülozik veya lignoselülozik artıklar sayılabilir.

5 Anaerobik fermantasyondan, anaerobik koşullar altında, örneğin bakteriler, mantarlar, algler veya mayalar gibi ökaryotik veya prokaryotik mikroorganizmalar tarafından yapılan bir fermantasyon anlaşılır.

10 Buluşun avantajlı ama zorunlu olmayan yönlerine göre, böyle bir yöntem aşağıdaki özelliklerden bir veya birkaçını içerebilir:

- c) aşaması sırasında, kullanılan halojenli bileşik dibromdur.

15 - c) aşaması sırasında, kullanılan halojenli bileşik dibromdan farklıdır.

- c) aşamasında, asetik anhidrit uçucu yağ asidine göre %12'ye yakın bir molar yüzdesinde kullanılır.

- c) aşaması sırasında, halojenlenecek uçucu yağ asidine (AGV) karşılık gelen bir anhidrit kullanılır.

20 - c) aşaması sırasında, brominasyon reaksiyonunun gerçekleştirildiği sıcaklık uçucu yağ asidinin kaynama sıcaklığından 20°C ila 40°C düşüktür.

- d) aşaması sırasında, kullanılan baz sodadır.

25 - d) aşaması sırasında, soda α -halojenli asitle eşit mol miktarındadır.

- d) aşaması sırasında, α -halojenli asidin sodayla reaksiyonu, 20°C ile 120°C arasında, avantajlı olarak 50°C ile 90°C arasında gerçekleştirilir.

30 - d) aşaması sırasında, α -halojenli asidin sodayla reaksiyonu, α -halojenli asidin en az dört karbonu varsa 50°C'ye yakın bir sıcaklık için ve α -halojenli asidin dörtten az karbonu varsa 90°C'ye yakın bir sıcaklık için optimumdur.

35 Buluş ve bunun diğer avantajları, sınırlayıcı olmayan örnek olarak verilen, buluşun birkaç gerçekleştirme şeklinin

tarifinin okunmasıyla daha açık olarak ortaya çıkacaktır.

Yöntemin çeşitli aşamaları şimdi birkaç gerçekleştirme şekline atıfta bulunularak tarif edilmektedir, bilinen aşamalar pek tabii ayrıntılı değildir.

5 Her şeyden önce, kullanılan substrat, avantajlı olarak, işlem görmemiştir, yani herhangi bir fiziksel-kimyasal veya enzimatik ön işlemden geçirilmemiştir. Bu substrat ağırlıklı olarak fermente edilebilir biyokütleden oluşturulur. Sınırlayıcı olmayan tamamlayıcı örnek olarak, 10 tarımsal veya bitkisel atıklar (saman, küspe, mısır, çim, odun, biçme maddesi), kâğıt atıkları (karton, kâğıt), tarımsal gıda atıkları, mezbaha atıkları, ev çöplerinin organik kısmı, hayvan yetiştiriciliği atıkları (gübreler, yarı sulu gübreler, kümes hayvanı gübreleri), algler, su ürünleri atıkları, 15 ormancılık atıkları veya kozmetik endüstrisinin fermente edilebilir eş ürünleri sayılabilir. Bazı substratlar, fermantasyon işlemini etkilemeyecek veya marjinal şekilde etki edecek, organik asitler gibi organik moleküller içerir. Buna karşılık, bu moleküller fermantasyon ortamında bulunabilir ve 20 örneğin tanımlanmış son organik moleküllerin üretimine katılabilir.

Hatırlatma olarak ve bilinen bir şekilde, substrat, kendi başına bilinen ve ister testler yapmak için laboratuvar ölçeğinde ister endüstriyel ölçekte olsun, istenen üretim için 25 boyutlandırılmış olan bir fermantasyon reaktörüne sokulur. Başka bir deyişle, fermantasyon reaktörü veya biyoreaktör, ihtiyaca göre, birkaç litre ile birkaç yüz metreküp arasında değişen bir hacme sahiptir.

Mikroorganizmalar, avantajlı olarak, ilk önce fermantasyon 30 reaktörüne, fermantasyonu başlatmak için yeterli bir miktarda sokulur. Mikroorganizmalar, avantajlı olarak, bir konsorsiyum halinde aşılır. Konsorsiyum terimi, bakteri, maya, mantar veya alg olsun, ökaryot ve prokaryot olan mikroorganizmaların bir karışımı veya karması anlamına gelir. Bu çeşitli 35 mikroorganizmalar, esasen doğal ekosistemlerden, avantajlı

olarak fakat özel olmayarak, sınırlayıcı olmayan örnek olarak, bazı göllerin anoksik bölgesi, topraklar, bataklıklar, kanalizasyon çamurları, gevişgetirenlerin işkembeleri veya termit bağırsağı gibi su ortamlarının anaerobik bölgesi gibi anaerobik ekosistemlerden gelir. Konsorsiyumdaki mikroorganizmaların farklı türlerinin ve cinslerini niteliksel ve niceliksel dağılımının tam olarak bilinmediği ve her şeyden önce önemli ölçüde değişebileceği akılda tutulmalıdır. Bu niteliksel ve niceliksel çeşitliliğin, şaşırtıcı bir şekilde, substratların optimum bir şekilde kullanımına imkân veren mikroorganizmaların sağlamlığını ve uyarlanabilirliğini, bu sonuncuların oluşumu nasıl olursa olsun ve değişken fermantasyon koşullarında olmak üzere, sağladığı ortaya çıkmıştır.

Diğer yandan, substrat, olduğu gibi kullanıldığından, yani sterilize edilmediğinden veya daha genel olarak, biyoreaktöre sokulmadan önce içerdiği mikroorganizmalardan temizlenmemiş olduğundan, substrata endemik olan mikroorganizmaların fiilen konsorsiyuma dahil olduğu ya da en azından biyoreaktörde bu sonuncuyla ilişkili olduğu ortaya çıkmaktadır.

Diğer yandan, fermentasyon anaerobik koşullar altında, daha kesin olarak redoks potansiyeli -300mV 'den düşük, avantajlı olarak -550mV ile -400mV arasında olduğunda ve pH 8'den düşük, tercihen 4 ile 7 arasında olduğunda gerçekleşir. Fermentasyon, avantajlı olarak, iki ila sekiz karbona, tercihen iki ila altı karbona sahip, ön madde denilen fermentasyon metabolitlerinin, yani uçucu yağ asitlerinin veya AGV'nin üretimiyle sınırlıdır. Böylece, gevişgetirenlerde karşılaşılan asidoz fenomenine benzer bir reaksiyon sınıra yakın bir metan üretimine neden olur. Metan, genellikle doğal ekosistemlerden türetilen mikroorganizmalar tarafından bir anaerobik fermantasyon sırasında elde edilen son fermantasyon metabolitlerinden biridir.

Fermantasyon, başlangıçta, asetik asit, propiyonik asit ve butirik asit gibi, esas olarak iki ila dört karbona sahip

uçucu yağ asitlerinin oluşumuna yol açar. Uzun zincirli ve dolayısıyla değerli ve kaproik, heptanoik veya oktanoik asitler gibi, dört karbondan daha az uçucu yağ asitleri de daha küçük miktarlarda elde edilir. Fermentasyona devam edilerek ve/veya biyoreaktördeki mikroorganizmaların miktarı artırılarak, gerekirse seçilen mikroorganizmalarla, uzun yani dört karbondan yüksek karbon zincirli AGV'lerin üretimini teşvik etmek mümkündür.

Başka bir deyişle, fermantasyon sırasında miktar olarak üretilen uçucu yağ asitleri, esasen iki ila altı karbonlu uçucu yağ asitleridir.

Fermantasyon her durumda sıvı fazda AGV üretimini sağlamak için yapılır. Tipik olarak, fermantasyon süresi 1 ile 7 gün arasında, tercihen 2 ile 4 gün arasındadır. Bu sürenin sonunda fermantasyon ortamında elde edilen metabolitlerin konsantrasyonu değişkendir, ancak uçucu yağ asitleri için, uçucu yağ asitlerine göre, genel olarak 10 ila 20 g/L'dir, pek tabii belirli koşullar altında, 35 g/L'den yüksek, örneğin 50 g/L'ye yakın olabilir. Fermantasyon aşamasının sonunda, fermantasyon ortamı, fermantasyon ortamında uçucu yağ asitlerinin bulunması nedeniyle, genel olarak 4 ile 6 arasında olan bir asidik pH'tadır.

AGV'nin üretimi tanımlanmış bir miktara ulaştığında, genellikle fermantasyonun sabit durum fazında, moleküllerin a) ekstraksiyon aşaması başlatılır. Tercihen ancak zorunlu olmayarak, bu tanımlanmış AGV miktarı, mikroorganizmaların büyümesinin yavaşlamasına, dolayısıyla mikroorganizmaların inhibisyon eşiği yakınına karşılık gelir.

Ekstraksiyon aracı, en azından fermantasyon ortamında çözünmeyen sıvı veya katı olan ekstraksiyon araçları arasından seçilir. Ekstraksiyon aracı sıvı olduğunda, dolayısıyla bir çözücü söz konusuysa, tercihen, çözücünün yoğunluğu fermantasyon ortamınıninkinden düşüktür.

Daha açık olarak, ekstraksiyon, uygulama koşulları biyoreaktörde baskın olan ve fermantasyonu gerçekleştirmek

için tanımlanmış olan fermantasyon koşulları altında mikroorganizmaların aktivitesini ve/veya büyümesini korumaya imkân veren katı veya sıvı bir ekstraksiyon aracıyla gerçekleştirilir. AGV molekülleri tercihen molekül aileleri tarafından ekstrakte edilir, sonra kendi başına bilinen tekniklerle avantajlı olarak ayrı ayrı ayrılır.

Uçucu yağ asitleri gibi moleküller fermantasyon ortamından ekstrakte edildiğinde, fermantasyon ortamının fiili asitlenmesi bu asitler tarafından azaltılır. Böylece, fermantasyon ve dolayısıyla metabolitlerin üretimi, başlangıç koşullarına benzer koşullar altında devam eder, fermantasyon ortamı hafif asidik kalır.

Ekstraksiyon, avantajlı olarak, sürekli veya en azından sırayla, örneğin her 12 saatte bir ekstraksiyonla gerçekleştirilir. Başka bir deyişle, üretilen metabolitleri gerek üretilirken gerek düzenli olarak, ekstrakte ederek fermantasyona devam etmek mümkündür.

Ekstraksiyon aracı olarak organik çözücülerle yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonu tercihen ama özel olmayarak seçilen ekstraksiyon şeklidir.

Bir gerçekleştirme şeklinde, ekstraksiyon fermantasyon reaktörünün ayrı bir organında değil, doğrudan onun içinde gerçekleştirilir. Çözücü, örneğin, reaktörün alt kısmında bulunan fıskiye tipi bir tertibatla sokulur. Varyant olarak, bir ekstraksiyon organı reaktörle birleştirilir, fermantasyon ortamıyla bir iletişim düzenlenir.

Ekstraksiyonun sonunda, b) toplama aşaması uygulanır. Bu aşama sırasında, AGV'ler, damıtma veya buharlaştırma gibi kendi başına bilinen tekniklerle organik fazdan itibaren toplanır.

Toplama, gerek AGV karışımı olarak gerek AGV türü başına gerçekleştirilir. AGV veya AGV karışımı seçiminin, istenen son molekül(ler)in türüne göre belirlemesi düşünülebilir. Bunun için toplama koşulları, tipik olarak buharlaşma veya damıtma parametreleri uyarlanır.

Bu toplama aşaması gerçekleşince, sonraki c) aşaması

gerçekleştirilir. Bu, avantajlı olarak ama özel olmayarak, toplama aşamasını takiben gerçekleştirilir. Varyant olarak, bu başka bir zamanda ve/veya başka bir yerde gerçekleştirilir üretilen AGV'ler, kendi başına bilinen tekniklere göre taşınır ve/veya saklanır.

5 Bu halojenleme aşaması, çok reaktif olan ve dolayısıyla başka moleküller üretmek için özellikle ilgi çekici olan bir molekül türü olan α -halojenli bir asit üretmek için bir halojeni bir AGV ile etkileşime sokmaktan ibarettir. Kendi başına bilinen böyle bir reaksiyon, tercih edilen bir şekilde, bromin eklenmesiyle gerçekleştirilir, pek tabii diğer halojenler, yani klorin, florin veya iyot veya fosfor trihalitler, halojenli asitler veya asil halitler gibi halojenli moleküller de kullanılabilir.

15 Bromlu bir α -haloasit karşılık gelen klorlu α -haloasitten daha reaktif olduğundan dibrom seçilmiştir, bir karbon-brom bağı bir karbon-klor bağından daha kolay kırılır. Dahası, sıvı formu nedeniyle bromun kullanımı daha kolaydır.

α -bromlu asit sentezini gerçekleştirmek için, yol bir anhidrit kullanır, burada asetik anhidrit ve piridin seçilmiştir. Örneğin polifosforik asit veya fosfor trihalitlerle olmak üzere, kendi başına bilinen başka sentez yolları da düşünülebilir. Polifosforik asitle testler yapılmıştır, ancak diğerlerinin yanında, bu bileşiğin kullanımı zorlaştıran yüksek viskozitesi nedeniyle sonuçlar ikna edici olmamıştır.

Başvuru sahibi tarafından α -klorlanmış asitlerin, örneğin trikloroizosiyanürik asitle sentezi için klorlama testleri de yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar dibrominle elde edilenlerden verim ve uygulama kolaylığı açısından düşüktür.

Halojenleştirilmek istenen uçucu yağ asidine karşılık gelen bir anhidrit kullanan sentez yolu ilginçtir ve burada belirli bir türde bir α -bromlu asit olan bir α -halojenli asit elde etmeye imkân verir. Asetik anhidridin iki ila altı karbonlu diğer AGV'lerle ve/veya bir AGV karışımı üzerinde

kullanılması, iki ila altı karbonlu bir α -halojenli asitler karışımı elde etmeye imkân verir.

Asetik asit (iki karbonlu AGV), propiyonik asit (üç karbonlu AGV), bütirik asit (dört karbonlu AGV), kaproik asit (altı karbonlu AGV) ve iki ila altı karbonlu bir AGV karışımı kullanılarak yapılan testler asetik anhidrit miktarının yanı sıra sıcaklık gibi diğer parametrelerin değiştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Çeşitli testler sırasında bir protokole uyulur. Ön fazda, bir AGV, asetik anhidrit ve piridin başlangıç karışımı geri akışlı ısıtılır. Sonra, fiili brominasyon sırasında, dibrom karışımın kaynama sıcaklığının altındaki bir sıcaklıkta birkaç saat boyunca yavaş yavaş eklenir, soğutulmadan önce karışım tekrar geri akışa getirilir. Reaksiyonun sonunda, avantajlı olarak, var olan anhidridi yok etmek için su eklenir. Ardından α -bromo asit aside göre farklı yöntemlerle ekstre edilir. Bu, örneğin, damıtma, ayırıcı ekstraksiyondur.

Karışımı geri akışa getirmek için başlangıç sıcaklığı iki karbonlu AGV'ler için 120°C ve altı karbonlu AGV'ler için 200°C arasındadır. AGV'lerin iki ila altı karbona sahip olmasına göre, brominasyon sıcaklığı 80°C ile 180°C arasında değişir. Brominasyon reaksiyonunun süresi, dolayısıyla dibromun eklenme süresi, altı karbonlu AGV'ler için yaklaşık bir saat ile iki karbonlu AGV'ler için yaklaşık dört saat arasında değişir.

İki, üç, dört, altı karbonlu uçucu yağ asidi brominasyon deneyleri ve ayrıca bir uçucu yağ asitleri karışımı üzerinde bir test gerçekleştirilmiştir:

Asetik asit (C2): 0,53 mol
Propiyonik asit (C3): 0,53 mol
Butirik asit (C4): 0,53 mol
Kaproik asit (C6): 0,24 mol
C2 ila C6'lı AGV karışımı: 0,54 mol.

Eklenen dibrom miktarı uçucu yağ asidinin fazla olması için 0,21 mol veya 0,11 mol'dür. Avantajlı olarak, başvuru sahibi AGV lehine 2:1'lik bir molar oranının optimum olduğunu bulmuştur.

5 Eklenen anhidrit miktarı, her bir asit için, bir test için 0,06 mol ve başka bir test için 0,03 mol'dür. AGV karışımı asetik (C2), propiyonik (C3), bütirik (C4), valerik (C5) ve kaproik (C6) asitleri içerir.

10 Ön faz sırasında geri akış sıcaklıkları AGV'ye göre değişir: asetik asit için 120°C; propiyonik asitli testler için 120°C ve 140°C; bütirik asit için 150°C ve 160°C; kaproik asit için 200°C ve karışım için 180°C.

Her bir asitle çeşitli testler için brominasyon sıcaklıkları uçucu yağ asidinin geri akış, dolayısıyla kaynama sıcaklıklarında 10°C ila 50°C ve avantajlı olarak 20°C ila 40°C düşüktür.

20 Çeşitli testlerin sonunda elde edilen α -bromlu asitlerin verimleri ve saflıkları aşağıda tablo 1'de gösterilmiştir. AGV'ler, basitleştirmek için, karbon sayısıyla belirtilmiştir.

25

Tablo 1

Asitler	Anhidrit miktarı (mol)	Brominasyon süresi(sa)	Geri akış sıcaklığı (°C)	Brominasyon sıcaklığı (°C)	Verim (%)	Saflık (%)
C2	0,06	2,2	120	100	87	98
C2	0,03	4	120	90	80	93
C3	0,06	3	120	80 ila 110	77	80
C3	0,03	3	140	125	100	93
C4	0,06	1,25	160	140	80	95
C4	0,03	3	150	110 ila 140	100	96
C6	0,03	0,92	200	150	100	uyg. değ.
karışım	0,06	1,5	180	130	100	uyg. değ.

Analiz ve verim hesaplamaları kendi başına bilinen analitik tekniklerle, yani NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) ve HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ile yapılmıştır. Verimler, tüketilen AGV miktarına göre tanımlanır.

Başvuru sahibi, dibrom eklenmesinden sonra, reaksiyon karışımında renk değişikliğiyle kendini gösteren reaksiyon hızının anhidrit miktarı daha yüksek olduğunda daha hızlı olduğunu bulmuştur, saflık ise az etkilenir. Bununla birlikte, ön ve brominasyon gibi iki aşamanın sıcaklığının optimum olması uygundur. Bunun için başvuru sahibi, uçucu yağ asidinin kaynama sıcaklığından düşük bir brominasyon sıcaklığının, bu sıcaklıktan çok uzak olmadan gerekli olduğunu belirtmiştir.

Farklı testler, uçucu yağ asidinin kaynama sıcaklığından yaklaşık 10°C ila 50°C düşük ve avantajlı olarak 20°C'den düşük bir brominasyon sıcaklığının, diğer tüm koşullar aynı olarak, tipik olarak %60 ile %100 arasında, 1 saat ila 4 saatlik bir reaksiyon süresiyle optimum bir verim elde etmeye imkân verdiğini tanımlamaya imkân vermiştir.

Asetik anhidridin rolüyle ilgili olarak, tablodaki sonuçların ışığında, AGV'ye göre anhidridin molar yüzdesinin optimum brominasyon reaksiyonu için %12'ye yakın olması gerektiği anlaşılmaktadır, %5 ile %20 arasındaki bir yüzde kabul edilebilirdir.

Arodından, elde edilen α -bromlu asitlerden, yani daha açık olarak belirli bir α -bromlu asitten d) aşaması sırasında aynı zamanda α -hidroksiasit olarak adlandırılan, belirli bir α -hidroksile asidin sentezi gerçekleştirilir. Bunun için bir baz eklenir. Avantajlı olarak ama özel olmayarak, bu sodadır.

Başvuru sahibi tarafından iki ila altı karbona sahip α -bromoasitler, yani bromoasetik asit, α -bromopropiyonik asit, α -bromobütirik asit, α -bromokaproik asit ve bir α -bromoasitler karışımı üzerinde sodanın (NaOH) ikamesiyle testler gerçekleştirilmiştir. Böyle bir ikame, sırasıyla iki, üç,

dört, beş veya altı karbonlu bir karbon zincirine sahip α -hidroksile asitleri, yani glikolik asit, laktik asit, α -hidroksibütirik, α -hidroksivalerik asit veya α -hidroksikaproik asit elde etmeye imkân verir.

5 Bu α -hidroksile asitler, polimerizasyondan sonra kozmetik veya gıda ambalajı üretmek için en çok kullanılanlar arasındadır. Buluşun konusu olan yöntemin, diğer PHA türlerinin polimerizasyonuna imkân veren başka tür asitlerin üretilmesine imkân verdiği kolayca anlaşılabilir. Örnek
10 olarak, α -hidroksidekanoik asitten sayılabilir.

Çeşitli testler için protokol, bir ila iki saatlik bir süre boyunca eş molar bir soda ve α -bromlu asit karışımının geri akışını sağlamaktan ibaretti. Isıtma sıcaklığı 80°C ile 120°C arasında değişmektedir. Düzenli aralıklarla alınan numuneler
15 en az üç karbonu olan asitler için verimin %60 ile %100 arasında ve avantajlı olarak %80 ile %100 arasında olduğunu göstermeye imkân vermiştir.

Aynı zamanda, dörtten çok karbona sahip bileşikler için sıcaklıktaki kademeli yükselme sırasında optimum verimin elde edildiği de görülmektedir. Böylece başvuru sahibi, sıcaklık α -
20 hidroksile asidin bozulmaya başladığı bir sıcaklığın altında kaldığında verimin optimum olduğunu bulmuştur, bu sıcaklık α -bromlu asidin kaynama sıcaklığından fiili olarak düşüktür.

Özelde, başvuru sahibi, şaşırtıcı bir şekilde, optimum verimin ulaşıldığı sıcaklığın 20°C ile 120°C arasında, avantajlı olarak 50°C ile 90°C arasında olduğunu bulmuştur.
25

Başvuru sahibi, özellikle, beklenmedik bir şekilde, optimum verimin ulaşıldığı sıcaklığın, en az dört karbona sahip α -bromlu asitler için 50°C 'ye ve dörtten az karbona sahip α -
30 bromlu asitler için 90°C 'ye yakın olduğunu bulmuştur, pek tabii C_2 ve C_3 α -hidroksile asitler için 100°C 'den yüksek bir sıcaklık bileşiğin bozunmasına neden olmaktadır.

Nitekim, optimum verime ulaşıldıktan sonra, dört karbona sahip α -bromlu asitler için, reaksiyon süresinde bir uzatma, bir
35 saat yerine iki saatlik bir reaksiyon süresi için yalnızca

minimum bir kazanç, örneğin verimde %4'lük bir kazanç sağlamaktadır.

Aşağıdaki tablo 2 gerçekleştirilen testlerden bazılarını göstermektedir.

5

Tablo 2

Halo-asitler	Mol asit	Mol NaOH	Isıtma sıcaklığı (°C)	Geri akış süresi (sa)	Verim (%)
BrC2	0,05	0,05	110-120	2	80
BrC2	0,05	0,05	110-120	2	85
BrC3	0,05	0,05	110-120	2	80
BrC4	0,05	0,05	110-120	2	100
BrC4	0,05	0,05	110-120	1	96
BrC6+BrC2	0,041+0,0019	0,043	100	1	95
BrC3+BrC2	0,05+0,014	0,064	100	2	62
BrC2-BrC6 karışımı	0,042	0,042	80	2	83

Analiz ve verim hesaplamaları daha önce sözü edilen NMR ve HPLC analitik teknikleriyle gerçekleştirilmiştir. Verimler başlangıçtaki halojenli asit miktarına göre tanımlanmaktadır.

Yöntemin son aşaması, elde edilen α -hidroksi asitten karşılık gelen polihidroksialkanat veya PHA'nın polimerizasyonundan ibarettir. Örnek olarak, gıda ambalajlarında kullanılan laktik poliasit veya PLA, dikiş malzemesi olarak tıbbi alanda kullanılan, glikolik poliasit veya PGA sayılabilir. PLA α -bromopropiyonik asitten elde edilen laktik asitten türetilir. PGA bromoasetik asitten elde edilen glikolik asitten türetilir.

Kendi başına bilinen bu polimerizasyon avantajlı olarak üç yolla gerçekleştirilir: halka açmalı polimerizasyonla (Ring-Opening Polymerization), katı faz polimerizasyonu veya doğrudan bir polikondensasyonla. Bu polimerizasyonu kendi başına bilinen PHA'nın geri kazanılması izler.

25