

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ENANTİYOMERİK SAFLIKTA 1-FENİL-1-PROPANOLÜN LİPAZ
KATALİZÖRLÜĞÜNDE ESTERLEŞME TEPKİMESİ İLE
KİNETİK REZOLÜSYONU**

Ayşe Pınar AKLAN

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2007**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ENANTIYOMERİK SAFLIKTA 1-FENİL-1-PROPANOLÜN LİPAZ KATALİZÖRLÜĞÜNDE ESTERLEŞME TEPKİMESİ İLE KİNETİK REZOLÜSYONU

Ayşe Pınar AKLAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emine BAYRAKTAR

Bu çalışmada, türevleri ilaç sanayisinde kullanılan 1-fenil-1-propanolün su aktivitesi kontrollü ortamda lipaz katalizli esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonu gerçekleştirilmiş ve tepkimeye etki eden lipaz kaynağı, açıl verici türü, çözücü türü, sıcaklık, moleküler elek miktarı ve su aktivitesi parametreleri incelenmiştir. Çalışmaların ilk aşamasında, öncelikle farklı serbest (*Candida antartica* Lipaz B, *Porcine pancreatic Lipaz*, *Candida antartica* Lipaz A, *Pseudomonas flouresans*) ve tutuklu enzimler (Novozym 435, Lipozym TL IM, Lipozym RM IM, Amona Lipase PS-CI(immobilized on ceramic)) ile çalışılarak enzim kaynağı seçilmiş ve tutuklamanın enzim aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Daha sonra sırası ile açıl verici türü (miristik asit, lauric asit, kaprik asit, hekzanoik asit, valerik asit, stearik asit), çözücü türü (oktan, sikloheksan, 2-2-4-trimetilpentan, tersiyer butil metil eter), moleküler elek miktarı (0-500 g) ve sıcaklık (0-50°C) parametreleri incelenmiş ve 1-fenil-1-propanolün kinetik rezolüsyonunda, en uygun koşullar olarak Novozym 435 katalizörlüğünde 40°C’de 300 mg moleküler elek ($a_w=0.32$), trimetilpentan çözücü ve kaprik asit açıl verici olarak kullanıldığında %68 dönüşümde elde edilen ee değeri %92 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise tepkime farklı su aktivitesi değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, su aktivitesinin tepkime boyunca sabit tutulabildiği doymuş tuz çiftleri [$\text{Na}_2\text{HPO}_4(7/12)$ ($a_w:0.90$), $\text{Na}_2\text{SO}_4(10/0)$ ($a_w:0.76$) $\text{Na}_2\text{HPO}_4(2/7)$ ($a_w:0.69$), $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2(3/0)$ ($a_w:0.33$), $\text{MnCl}_2(2/4)$ ($a_w:0.33$), $\text{MgCl}_2(6/0)$ ($a_w:0.06$)] ile a_w kontrolü ve başlangıç su aktivitesinin belirlendiği doymuş tuz çözeltileri [$(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($a_w:0.98$), NaCl (0.75), $(\text{MgNO}_3).6\text{H}_2\text{O}$ ($a_w:0.54$), CH_3COOK ($a_w:0.23$), LiBr ($a_w:0.15$), LiCl (0.11)] ile a_w kontrolü yöntemleri kullanılmıştır. Doymuş tuz çiftleri kullanılan deneyler dört farklı substrat derişiminde(50mM, 168 mM, 250 mM ve 330 mM) gerçekleştirilmiş ve substrat derişiminin tepkime başlangıç hızına (r_0) ve ee’ye etkisi incelenmiştir. Tuz çiftleri ile a_w kontrolünün yapıldığı deneylerde, her substrat derişimi için en yüksek ee değerleri a_w 0.33 de elde edilmiş ve en iyi sonuçlara düşük substrat derişiminde (50mM), %55 dönüşümde en yüksek ee (%91) MnCl_2 (6/0)($a_w:0.33$) tuzu ile ulaşılmıştır. Doymuş tuz çiftleri ile yapılan deneylerde su aktivitesi değeri arttıkça r_0 ‘ın arttığı fakat ee’nin azaldığı gözlenmiştir. LiBr ($a_w:0.11$) tuzu ile %49 dönüşümde ee % 88 olarak elde edilmiştir.

Aralık 2007, 116 Sayfa

Anahtar Kelimeler:1-fenil-1-propanol, kinetik rezolüsyon, su aktivitesi, tuz çifti, doymuş tuz çözeltileri

ABSTRACT

Master Thesis

KINETIC RESOLUTION OF ENANTIOMERICALLY PURE 1-PHENYL-1-PROPANOL BY LIPASE CATALYZED ESTERIFICATION

Ayşe Pınar AKLAN

Ankara University
Graduate School of Naturel and Applied Science
Department of Chemical Engineering

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Emine BAYRAKTAR

In this study; the kinetic resolution of 1-phenyl-1-propanol an important intermediate in pharmaceutical industry, was carried out by lipase catalyzed esterification reaction under controlled water activity and the effects of lipase resource, acyl donor type, solvent type, temperature, molecular sieve amount and water activity parameters were investigated. At the first stage of the studies, primarily lipase resource was selected by working with the native (*Candida antarctica* Lipase B, *Porcine pancreatic Lipase*, *Candida antarctica* Lipase A, *Pseudomonas fluorescens*) and immobilized lipases (Novozym 435, Lipozym TL IM, Lipozym RM IM, Amona Lipase PS-CI (immobilized on ceramic)). It is observed that the enzyme activity is increased by immobilization. Later on, the acyl donor type (myristic acid, lauric acid, capric acid, hexanoic acid, valeric acid, stearic acid), solvent type (octane, cyclohexane, 2-2-4-trimethylpentane, tert-butylmethylether), molecular sieve amount (0-500 mg) and temperature (0-50 °C) parameters were investigated. In the kinetic resolution of 1-phenyl-1-propanol with the catalysis of Novozyme 435, when 300 mg molecular sieve ($a_w = 0.33$) at 40°C 2-2-4-trimethylpentane as solvent and capric acid as acyl donor were used, obtained ee% value 92% at the 68% conversion was specified as the best conditions. In the second stage of the study; the reaction was carried out at different water activity values. In those reactions, salt hydrated pairs that holds the water activity constant during the esterification reaction period [$\text{Na}_2\text{HPO}_4(7/12)$ ($a_w:0.90$), $\text{Na}_2\text{SO}_4(10/0)$ ($a_w:0.76$) Na_2HPO_4 (2/7) ($a_w:0.69$), $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2(3/0)$ ($a_w:0.33$), $\text{MnCl}_2(2/4)$ ($a_w:0.33$), $\text{MgCl}_2(6/0)$ ($a_w:0.06$)] was used to control a_w and secondly saturated salt solutions [$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($a_w:0.98$), NaCl ($a_w:0.75$), $\text{MgNO}_3.6\text{H}_2\text{O}$ ($a_w:0.54$), CH_3COOK ($a_w:0.23$), LiBr ($a_w:0.15$), LiCl ($a_w:0.11$)] was used to set the initial a_w . The reactions in which salt hydrated pairs used, was carried out at four different substrate concentration to investigate the effect of substrate concentration on the ee value and the initial rates (r_0). For every substrate concentration maximum ee value was obtained at $a_w=0.33$ and best results obtained at low substrate concentration (50 M) at 55% conversion, 91% ee and with $\text{MnCl}_2(6/0)$. In the reactions which are carried out with saturated salt solutions, it was observed that ee value was decreased when the a_w value increased. The best result obtained with saturated salt solutions are 88% ee with the conversion 49%.

December 2007, 116 pages

Key Words: 1-phenyl-1-propanol, kinetic resolution, water activity, salt hydrated pair, saturated salt solutions

TEŞEKKÜR

Enantiyomerik saflıkta 1-fenil–1-propanolün lipaz katalizörlüğünde esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu konulu bu çalışma Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Grubu’nda yürütülmüştür.

Yüksek lisans çalışması için Biyoteknoloji Araştırma Grubuna girdiğim andan itibaren kendimi bir aile ortamında hissettim. Her aşamada bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, geniş hoşgörü ve yardımları ile bana iyi bir çalışma ortamı sağlayan, gerek maddi gerek manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve hayatım boyunca mesleki ve kişisel açıdan model alacağım danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Emine BAYRAKTAR’a çok teşekkür ederim.

Haftalık araştırma grubu toplantılarımızda ve diğer zamanlarda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve karşılaştığım problemleri hiç çekinmeden danıştığım Sayın Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU’a teşekkür ederim.

Araştırma sonuçlarımla ilgili yorumlarını aldığım ve her zaman bilgi ve tecrübesiyle bana destek olan Sayın Doç. Dr. Afife GÜVENÇ’e teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecim boyunca, benden çok uzakta olmasına rağmen yardımını esirgemeyen, her zaman sorunlarıma bir çözüm üretebilen, arkadaşlıktan öte bana kardeşlik eden kadim dostum Kimya Yüksek Mühendisi Aybala GENÇASLAN’a ve yine bana her zaman destek olan, birlikte birçok anı paylaştığım, enerjisi ile hayatıma renk katan Kimya Yüksek Mühendisi Nurhan GÜNGÖR’e çok teşekkür ederim.

Son olarak; başarıım için maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, bana her zaman güvenen ve yanımda olan sevgili annem Filiz AKLAN, sevgili babam Ali Muhsin AKLAN ve sevgili kardeşim Pelin AKLAN’a çok teşekkür ederim.

Ayşe Pınar AKLAN
Ankara, Aralık 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1 Stereokimya	3
2.1.1 Yapısal izomerler	4
2.1.2 Stereoizomerler	5
2.1.2.1 Diastereomerler	5
2.1.2.2 Enantiyomerler.....	6
2.1.3 Enantiyomerlerin biyolojik etkileri.....	7
2.2 Rasemik Karışımların Ayrılması (Rezolüsyon)	8
2.3 Enantiyomerik Olarak Saf Bileşiklerin Elde Edilmesi	9
2.3.1 Stereoseçimli sentez.....	9
2.3.1.1 Kiral başlangıç substratı	10
2.3.1.2 Kiral ayırıcılar (Kiralite Faktörü).....	10
2.3.1.3 Kiral çevre	10
2.3.2 Rasematların rezolüsyonu	11
2.3.2.1 Tercihli kristalizasyon	11
2.3.2.2 Diastereomer kristalizasyonu	11
2.3.2.3 Kromatografi.....	12
2.3.2.4 Kinetik rezolüsyon	12
2.4 Enantiyoseçimlilik.....	14
2.5 Enzimler	15
2.5.1 Enzimlerin yapısı.....	18
2.5.2 Enzimlerin üç boyutlu yapısına etki eden faktörler	19
2.5.3 Enzimlerin çalışma mekanizması	19
2.5.4 Enzimlerin sınıflandırılması.....	20
2.6 Lipazlar	22
2.6.1 Lipazların yapısı.....	23
2.6.2 Lipazların kullanım alanları	26
2.6.3 Lipazların katalizlediği tepkimeler	27
2.7 Tutuklama.....	29
2.7.1 Tutuklama yöntemleri	29
2.7.2 Tutuklama işleminin sağladığı avantajlar ve dezavantajlar	35
2.8 Enzimatik tepkimelerde su etkisi.....	36
2.8.1 Lipaz katalizli esterleşme tepkimelerde su aktivitesi (a_w)	37
2.8.2 Su aktivitesi.....	38
2.8.2.1 Su aktivitesinin ölçülmesi	39
2.8.3 Su aktivitesinin (a_w) ayarlanması ya da kontrol edilmesi.....	40
2.8.3.1.Tuz çiftleri kullanılarak a_w kontrolü.....	41
2.8.3.2 Doygun tuz çözeltileri ile a_w kontrolü.....	44

2.8.3.3 Pervaporasyon	45
2.8.3.4 Moleküler elek ekleme	45
2.8.3.5 Su aktivite kontrolünün pilot ölçek için dezavantajları	46
2.9 Kaynak Araştırması.....	46
2.9.1 Sekonder alkollerin kinetik rezolüsyonu	46
2.9.2 Tuz çiftleri ve doymuş tuz çözeltileri ile a_w kontrolü	48
2.10 1-Fenil -1-propanol	50
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	53
3.1 Materyal	53
3.1.1 Alkol	53
3.1.2 Enzim.....	53
3.1.3 Açıl verici	54
3.1.4 Çözücüler	54
3.1.5 Tuzlar	55
3.1.6 Moleküler elek, TLC kağıdı	56
3.2 Yöntem	56
3.2.1 Rasemik 1-fenil 1-propanolün kinetik rezolüsyonu	56
3.2.2 HPLC analizleri.....	57
3.2.3 Lipaz aktivitesinin belirlenmesi	58
3.2.4 Su aktivitesi ölçümü	58
3.2.5 Başlangıç tepkime hızının belirlenmesi.....	58
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	59
4.1 (R,S)-1-Fenil-1-propanolün Kinetik Rezolüsyonu	59
4.1.1 Lipaz kaynağı etkisi	59
4.1.2 Acil verici ve çözücü türü etkisi	62
4.1.3 Çözücü türü etkisi	64
4.1.4 Moleküler elek miktarı etkisi	67
4.1.5 Sıcaklık etkisi.....	69
4.2 Su aktivitesi kontrolünün tuz hidratlarla yapıldığı çalışmalar	70
4.2.1 Tuz miktarı	72
4.2.2 Substrat derişiminin tepkime başlangıç hızına etkisi	74
4.2.3 Substrat derişiminin enantiyoseçimliliğe etkisi.....	77
4.2.4. Tuz hidrat çiftlerinin enzim aktivitesine etkisi.....	80
4.3 Doymuş tuz çözeltileri ile a_w kontrolü.....	82
4.3.1 Doymuş tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde tepkime başlangıç hızı.....	83
4.3.2 Doymuş tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde ee ve dönüşüm.....	84
4.3.3 Doymuş tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde enzim aktivitesi	87
5. SONUÇLAR	88
KAYNAKLAR	92
EK 1 Tuz çiftleri için A ve B sabitlerinin değerleri.....	100
EK 2 1-fenil-1-propanol'ün özellikleri	102
EK 3 Açıl vericilerin fiziksel özellikleri.....	103
EK 4 Çözücülere ait bazı özellikler	104
EK 5 Hazırlanan örneklere ait kromatogramlar	105
Ek 6 pH stat yöntemi ile örnek aktivite hesaplanması	106
EK 7 Farklı substrat derişimlerinde t-Ca grafikleri.....	107
Ek 8 Toplu Sonuçlar	109
ÖZGEÇMİŞ.....	116

SİMGELER DİZİNİ

a_w	Su aktivitesi
C_0	Başlangıç derişimi
E	Enantiyomerik oran
ee	Enantiyomerik aşırılık
$ee(P)$	Ürün için enantiyomerik aşırılık
$ee(S)$	Substrat için enantiyomerik aşırılık
f	Fugasite
k_R, k_S, k_1, k_2	Hız sabitleri
$\log P$	Çözücünün 1-oktanol ve su içerisindeki dağılıma katsayısı
N	Karıştırma hızı
P	Suyun kısmi basıncı
P_i°	Saf suyun aynı sıcaklıktaki doygun buhar basıncı
r_0	Başlangıç hızı
R	Mutlak konfigürasyonu R olan enantiyomer
S	Mutlak konfigürasyonu S olan enantiyomer
T	Sıcaklık
t	Zaman
U	Aktivite
U/mg	Spesifik aktivite
x	Dönüşüm
X_w	Çözücü içinde suyun mol kesri
$\mu; (J/mol)$	Sistemin kimyasal potansiyeli
$\mu_0, T (^{\circ}K)$	T Sıcaklığında saf materyalin kimyasal potansiyeli
γ_w	Çözücü içinde suyun aktivite katsayısı

KISALTMALAR

CRL	<i>Candida rugosa</i> lipazı
HA	Hekzanoik asit
HPLC	Yüksek performans sıvı kromografisi
KA	Kaprik asit
LA	Laurik asit
MA	Miristik asit
PPL	Porcine pancreatic lipaz
PS	<i>Pseudomonas cepacia</i>
SA	Stearik asit
TBME	ter-butil metil eter
TLC	İnce tabaka kromatografi
TMP	2-2-4-Trimetilpentan (İzooktan)
VA	Valerik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kiral molekülde stereojenik merkez.....	2
Şekil 2.2 Klordiflorometanın ayna görüntüleri.....	3
Şekil 2.3 İzomerlerin sınıflandırılması.....	4
Şekil 2.4 n- bütan ve izobütan (metil propan)'ın geometrik izomerleri.....	4
Şekil 2.5 2,3-Dibromobütanın diastereomerleri.....	5
Şekil 2.6 Kiral Obje.....	6
Şekil 2.7 Adrenalin molekülünün enantiyomerleri.....	6
Şekil 2.8 Penisilamin, terpen alkol ve asparjinin enantiyomerlerinin biyolojik etkileri.....	8
Şekil 2.9 Enantiyomerik olarak saf bileşiklerin elde edilmesi.....	9
Şekil 2.10 Stereoseçimli sentez.....	10
Şekil 2.11 Katalitik kinetik rezolüsyon.....	12
Şekil 2.12 Kinetik rezolüsyon.....	13
Şekil 2.13 Dinamik kinetik rezolüsyon.....	14
Şekil 2.14 Enzim aktif merkezinin stereospesifikliğı.....	17
Şekil 2.15 <i>Humicola lanuginosa</i> lipazının kristal yapısı.....	25
Şekil 2.16 <i>Humicola lanuginosa</i> Lipaz (a) Açık form (b) Kapalı form.....	25
Şekil 2.17 Bazı lipazların tersiyer yapıları.....	26
Şekil 2.18 Lipazların katalizlediğı tepkimeler.....	28
Şekil 2.19 Katıya bağlama.....	31
Şekil 2.20 Çapraz bağlama.....	34
Şekil 2.21 a) Kafes tipi çapraz bağlama b) Mikrokapsülleme.....	34
Şekil 2.22 Doygun tuz çözeltileri ile organik faz ve biyokatalizörün sabit a_w değerinde ön dengeye getirilmesi.....	44
Şekil 2.23 Doygun tuz çözeltileri ile sürekli a_w kontrolü.....	45
Şekil 2.24 (1S,2R)-D-eritro-2-(N-Myristoylamino)-1-fenil-1-propanol açık formülü.....	50
Şekil 2.25(1RS,2SR)-($\pm$)-2-amino-1-fenil-1-propanol'ün iki aşamalı tepkimesi.....	51
Şekil 2.27 (R) 1-Fenil-1-propanol ile MBBA molkülünün birincil etkileşimi.....	52
Şekil 3.1 (R,S)-1-fenil-1-propanolün esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonu.....	53
Şekil 4.1 Serbest enzimlerin enantiyomerik aşırılığa etkisi.....	60
Şekil 4.2 Tutuklu enzimlerin enantiyomerik aşırılığa etkisi.....	61
Şekil 4.3 Açıl vericilerin ve tepkime süresinin dönüşüme etkisi.....	62
Şekil 4.4 Açıl vericilerin ve tepkime süresinin enantiyomerik aşırılığa etkisi.....	63
Şekil 4.5 Açıl vericilerin dönüşüme ve enantiyomerik aşırılığa etkisi.....	64
Şekil 4.6 Laurik asitin açıl verici olarak kullanıldığı çözücü deneylerinde tepkime süresi ile dönüşümün değişimi.....	65
Şekil 4.7 Kaprik asitin açıl verici olarak kullanıldığı çözücü deneylerinde tepkime süresi ile dönüşümün değişimi.....	66
Şekil 4.8 Laurik asitin açıl verici olarak kullanıldığı çözücü deneylerinde tepkime süresi ile enantiyomerik aşırılığın değişimi.....	66
Şekil 4.9 Kaprik asitin açıl verici olarak kullanıldığı çözücü deneylerinde tepkime süresi ile enantiyomerik aşırılığın değişimi.....	66

Şekil 4.10 Çözücü türünün enantiyomerik aşırılığa ve dönüşüme etkisi	67
Şekil 4.11 Moleküler elek miktarı ile a_w 'nin değişimi	68
Şekil 4.12 Moleküler elek miktarının enantiyomerik aşırılığa ve dönüşüme etkisi	68
Şekil 4.13 Sıcaklığın enantiyomerik aşırılığa ve dönüşüme etkisi	70
Şekil 4.14 Tuz çiftlerinin a_w değerleri.....	71
Şekil 4.15 168 mM Substrat derişiminde zaman-ee	72
Şekil 4.16 168 mM Substrat derişiminde zaman-ee.....	73
Şekil 4.17 50 mM substrat derişiminde farklı a_w değerlerinde zamanla dönüşümün değişimi	74
Şekil 4.18 168 mM Substrat derişiminde zaman-dönüşüm ilişkisi.....	74
Şekil 4.19 250 mM substrat derişiminde farklı a_w değerlerinde zamanla dönüşümün değişimi	75
Şekil 4.20 330 mM substrat derişiminde farklı a_w değerlerinde zamanla dönüşümün değişimi	75
Şekil 4.21 Farklı substart derişimleri ve a_w değerlerinde başlangıç hızı değerleri.....	76
Şekil 4.22 50 mM substrat derişiminde farklı a_w de dönüşüm ve ee değerleri	77
Şekil 4.23 168 mM substrat derişiminde a_w ile dönüşüm ve ee'nin karşılaştırılması	78
Şekil 4.24 250 mM substrat derişiminde a_w ile dönüşüm ve ee'lerin karşılaştırılması	78
Şekil 4.25 330 mM substrat derişiminde a_w ile dönüşüm ve ee'lerin karşılaştırılması	79
Şekil 4.26 Farklı substrat derişimlerinde % ee'nin a_w ile değişimi.....	79
Şekil 4.27 Farklı a_w değerlerinde ee'nin substrat derişimi ile değişimi	80
Şekil 4.28 Tuz çiftlerinin enzim aktivitesine etkisi.....	81
Şekil 4.29 Doygun tuz çözeltilerinin a_w değerleri.....	83
Şekil 4.30 Doygun tuz çözeltileri ile r_o	84
Şekil 4.31 Doygun tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde tepkime süresi ile dönüşümün değişimi	85
Şekil 4.32 Doygun tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde tepkime süresi ile enantiyomerik aşırılığın değişimi.....	85
Şekil 4.33 Doygun tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde farklı a_w değerlerinde x ve ee değerleri	86
Şekil 4.34 Doygun tuz çözeltileri başlangıç a_w değeri belirlenen tepkime ortamının enzim aktivitesine etkisi.....	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Lipazların endüstriyel uygulama alanları.....	27
Çizelge 3.1 Tuz hidrat çiftlerine ait aw değerleri.....	55
Çizelge 3.2 Doygun tuz çözeltilerine ait aw değerleri	55

1. GİRİŞ

Vücudumuzdaki birçok hayati molekül optikçe aktif bir diğer deyişle asimettiktir. Enzimlerin vücuttaki fonksiyonlarının seçiciliğini sağlayan faktör de yine asimettiklidir. Asimettiklik, maddenin sadece tek bir enantiyomer halinde bulunmasıdır. Enantiyomerin ayrılması biyokimya, kozmetik, gıda ve özellikle farmasötik sektörlerinde önemlidir. Bunun nedeni genel olarak enantiyomerlerden yalnızca bir tanesinin biyolojik olarak aktif olması ya da farmakolojik açıdan ilgi görmesidir. İstenmeyen enantiyomer safsızlık olarak nitelendirilir, yan etki ve toksik etki gösterebilir ya da diğer enantiyomerin etkisini azaltacak yönde etki gösterebilir. Özellikle ilaç etken maddelerinde istenmeyen enantiyomerin % 0.1 seviyesine düşürülmesi istenir (Kordikowski *et al.* 1998).

Optikçe aktif saf enantiyomerler hedefe spesifiktirler ve rasemik karışımlardan daha az yan etkiye sahiptirler. Çoğu üretici iki enantiyomer içeren veya rasemat bileşikler yerine optikçe aktif tek enantiyomeri tercih etmektedirler. Dolayısıyla ilaç olarak kullanılabilecek aktif enantiyomeri ayırmak, diğer enantiyomerin hastada oluşturduğu olumsuz etkileri engellemek açısından büyük önem taşır. Tek enantiyomerli ilaç satışları dünya çapında sürekli olarak büyümektedir. Bu da günümüzde ilaç sektöründe optikçe aktif ilaçlarda enantiyomerlerin ayrılmasının önemini göstermektedir.

Enantiyomerik saflıktaki kiral alkoller pek çok farmakolojik ürünün çıkış maddesidir. Sekonder alkol olan 1-fenil-1-propanol türevleri ilaç etken maddesi olarak farmasotik sanayinde geniş kullanım alanına sahiptir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudoephedrine>).

Enantiyomerik olarak saf ürünlerin elde edilmesinde biyokatalitik üretim, enzimlerin ılımlı koşullarda çalışması, stereoseçimli olmaları ve bozunma izomerizasyon ve rasemizasyon gibi yan tepkimeleri engellemesinden dolayı daha avantajlıdır.

Esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini organik ortamda katalizleyebilen lipaz enzimi, endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılır.

Organik çözücülerle çalışılan ortamlarda enzim aktivitesini etkileyen önemli parametrelerden biri ortamın su içeriğidir ve en iyi şekilde su aktivitesi (a_w) ile açıklanır. Su aktivitesi; suyun belli bir sıcaklıkta üzerinde bulunan su buharına ait kısmi basıncının, aynı sıcaklıkta saf suyun buhar basıncına oranıdır.

Su aktivitesi enzimle birlikte olan su miktarının belirlenmesi enzimin dolayısı ile proteinin katalitik aktivitesini belirlemede yardımcı olur. Tepkime ortamının su aktivitesi literatürde tanımlanmış birkaç yöntemle kontrol edilebilir.

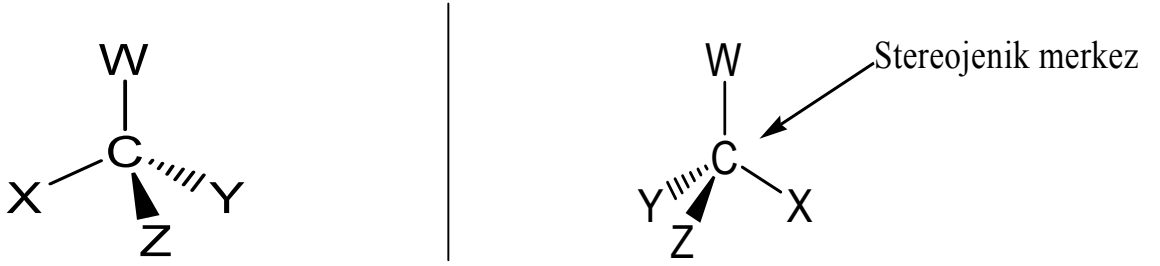
Biyokatalitik üretim kimyasal yolla yapılan üretime oranla daha avantajlıdır. Biyokatalizörlerin gerçekleştirdiği tepkimeler çevre için tehlike arz etmez. Ilımlı koşullarda tepkimeleri gerçekleştirdiklerinden dolayı bozunma, izomerizasyon ve rasemizasyon gibi istenmeyen yan tepkimeler önlenir. Biyokatalizörler sayısız tepkimeleri katalizleyebilirler ve stereoseçimlilikleri yüksektir. Bu nedenlerle biyokatalitik olarak farmasotik ürünlerin sentezi ve optik olarak saf ilaçların stereoseçimli olarak elde edilmesi için katalizör olarak enzim ya da mikroorganizmaların kullanımı büyük ölçüde önem kazanmış ve biyolojik katalizörlerin kullanıldığı çalışmalar giderek artmıştır.

Bu tez çalışmasında, (R,S)-1-fenil-1-propanolün lipaz katalizli esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonu ile R ve S enantiyomerlerin birbirinden en yüksek verimle ayrılması amaçlanmıştır. 1-fenil-1-propanolün lipaz katalizli esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonuna, lipaz kaynağı, çözücü türü, açıl verici türü, sıcaklık etkisi, tutuklama işlemi ve su aktivitesi parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Su aktivitesi tuz çiftleri ve doymuş tuz çözeltileri kullanılarak kontrol edilmiştir. Tuz hidrat çiftleri ile yapılan a_w kontrolünde ayrıca; tuz miktarı, tuz cinsi, substrat derişimi parametreleri incelenmiş ve tepkime başlangıç hızları belirlenmiştir. Her iki kontrol yönteminde tuzların enzim aktivitesine etkileri incelenmiştir.

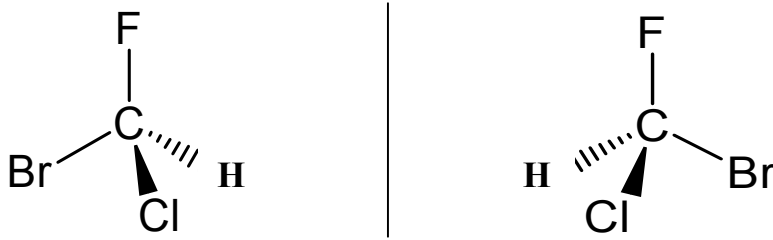
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Stereokimya

Stereokimya, moleküllerdeki atom veya grupların üç boyutlu düzenlemeleridir. Ayna görüntüsü ile üst üste çakışmayan bir nesne kiraldir. Genel olarak w, x, y ve z gibi dört farklı atom ya da grubunun bağlı olduğu karbon içeren moleküller kiral moleküller olarak adlandırılırlar ve bu karbon merkezide stereojenik merkez olarak tanımlanır (Şekil 2.1). Stereojenik merkez ayrıca kiral merkez, asimetric merkez ve stereomerkez olarak da adlandırılır (Şekil 2.2).

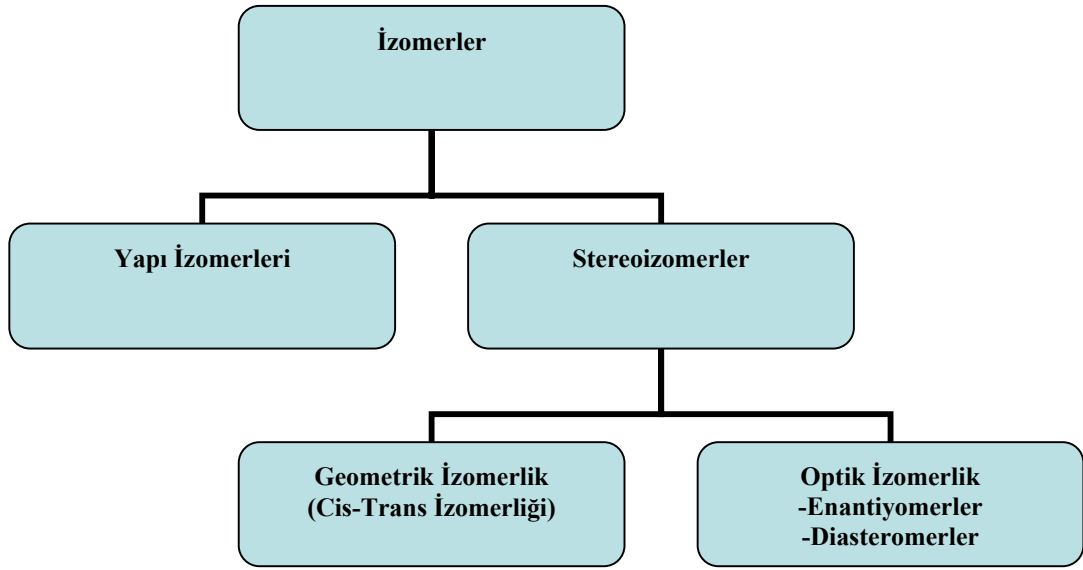


Şekil 2.1 Kiral molekülde stereojenik merkez



Şekil 2.2 Klordiflorometanın ayna görüntüleri

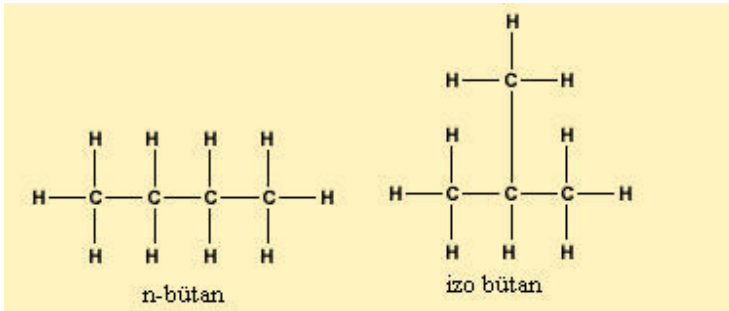
İzomerler, aynı molekül formülüne sahip olan farklı bileşiklerdir. Şekil 2.3'te de belirtildiği gibi tüm izomerler ya geometrik (yapısal) ya da optik izomerler (stereoizomerler) dir.



Şekil 2.3 İzomerlerin sınıflandırılması

2.1.1 Yapısal izomerler

Bu tür izomerler bağlanma yönünden farklılık gösterirler. Diğer bir deyişle, atomların birbirlerine bağlanış sıraları farklıdır. Bu yapıya örnek olarak n-bütan ve izobütan verilebilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 n- bütan ve izobütan (metil propan)'ın geometrik izomerleri

Bütanda düz zincir halinde dört karbon atomu sıralanırken, izobütanda üçlü karbon zinciri ve ikinci karbondan dallanma görülmektedir.

2.1.2 Stereoizomerler

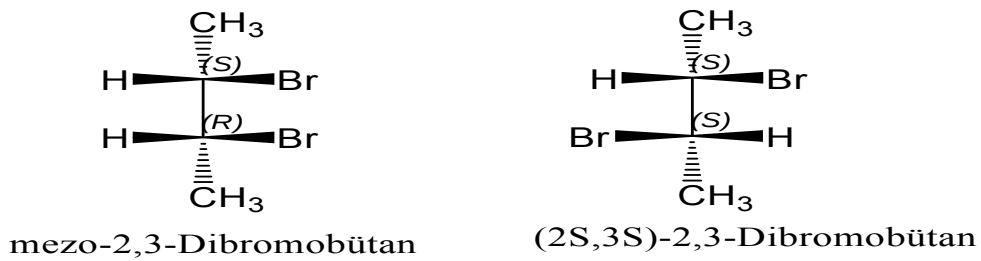
Stereoizomerler, aynı sırayla birbirine bağlanmış aynı atomlardan oluşan, fakat değişik üç boyutlu yapıları olan bileşiklerdir. Enantiyomerlerin saf çözeltileri düzlem polarize ışığı aynı derecede farklı yönlerde çevirirler. Bu nedenle, stereoizomerler aynı zamanda optik izomerler olarak da adlandırılır. Optikçe aktif moleküller polarize ışığı belli bir açıda çevirirler. Bu açıya optik dönme açısı denir. Maddeden maddeye göre değiştiği için maddelerin ayırt edici özellikleri arasındadır.

Stereoizomerler;

- Optik İzomerler (Enantiyomerler)
 - Geometrik izomerler
- olarak gruplandırılırlar.

2.1.2.1 Diastereomerler

Diastereoizomerler, bir molekül içinde bir taneden fazla stereo merkez bulunduğu zaman ortaya çıkan enantiyomerik olmayan izomerlerdir. 2,3-Dibromobütanın iki stereoizomeri Şekil 2.5’de gösterilmiştir.



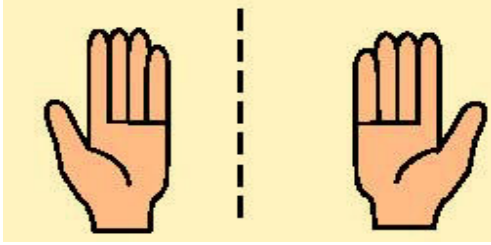
Şekil 2.5 2,3-Dibromobütanın diastereomerleri

Diastereomerler fiziksel olarak farklı iki madde gibi davranırlar. Benzer kimyasal tepkime verebilirler. Optikçe aktif bileşiklerle diastereomerlerin tepkime hızları belirgin farklılık

gösterir. Fiziksel yöntemlerle birbirlerinden ayrılabilirler. Biyolojik aktiviteleri tamamen farklıdır (Solomons and Fryhle 2000). Sadece bir kiral merkezde değişiklik gösteren diastereomerler genelde epimerler olarak adlandırılırlar.

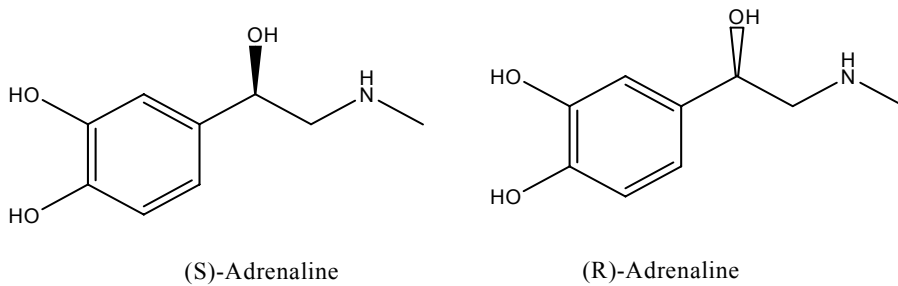
2.1.2.2 Enantiyomerler

Kiral bir objenin her iki formu enantiyomerler olarak adlandırılırlar. Kiral objeler, Şekil 2.6’de görüldüğü gibi ayna görüntüsüyle üst üste konulup çakıştırılamaz. Kiral olmayan objeler ise, ayna görüntüleriyle üst üste konulup çakıştırılabilirler.



Şekil 2.6 Kiral Obje

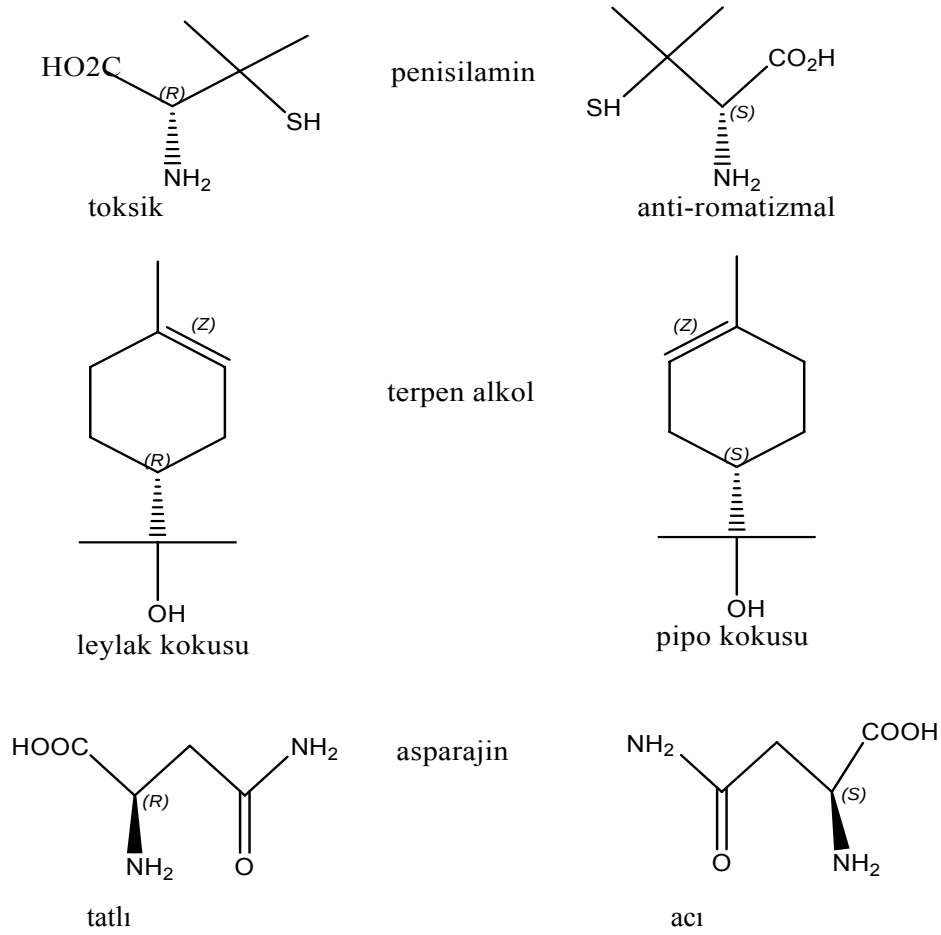
Kiral bileşiklerde, sp^3 hibritleşmesine uğramış tetrahedral bir karbon atomu $CR_1R_2R_3R_4$ gibi dört farklı bağlı grup taşır. Bu karbon atomu asimetric karbon olarak adlandırılır. C^* ile gösterilir. Optikçe aktif her maddenin iki tane enantiyomeri vardır (Şekil 2.7). Bunların optik dönme açıları rakam olarak aynı ama işaret olarak tam terstir. Chan-Ingold-Prelog sistemine göre biri (R) iken diğeri (S) enantiyomeri oluştururlar.



Şekil 2.7 Adrenalin molekülünün enantiyomerleri

2.1.3 Enantiyomerlerin biyolojik etkileri

Enantiyomerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri aynı olmasına rağmen biyolojik etkileri birbirinden tamamen farklıdır. Uzayda atomların düzenlenmesine bağlı olarak farklı özellikler gösterebilirler. Örneğin İbuprofen'in ağrı kesici özelliğinden sorumlu olan S enantiyomeridir. R enantiyomeri ise aktif değildir. Ayrıca Avrupa da yatıştırıcı ve mide bulantısını önleyici bir ilaç olarak kullanılan Talidomit'in R enantiyomeri yararlı özellikleri gösterirken S enantiyomerin teratojenik etki yaptığı ve 2000 den fazla kadın tarafından doğrulan çocuklarda ciddi boyutlarda doğum kusurlarına sebep olduğu tespit edilmiştir. Bunun dışında Penisilamin, terpen alkol ve asparajinin gibi birçok maddenin enantiyomerleri farklı özellikler göstermektedir (Şekil 2.8). İlaç etken maddesinde istenmeyen enantiyomerin % 0.1 seviyesine düşürülmesi istenir. Bu nedenle de bu enantiyomerlerin ayrılması farmakoloji endüstrisi için büyük öneme sahiptir (Kordikowski *et al.* 1998). Rasematdaki izomerlerden yalnızca bir tanesinin aktif olmasından dolayı optikçe aktif bileşiklerin kullanımı biyokimya, farmasotik gıda ve parfüm endüstrisi için önemlidir. Çoğu üretici iki enantiyomer içeren veya rasemat bileşikler yerine optikçe aktif tek enantiyomeri tercih etmektedirler. Dolayısıyla ilaç olarak kullanılabilecek aktif enantiyomeri ayırmak, diğer enantiyomerin hastada oluşturduğu olumsuz etkileri engellemek açısından büyük önem taşımaktadır.



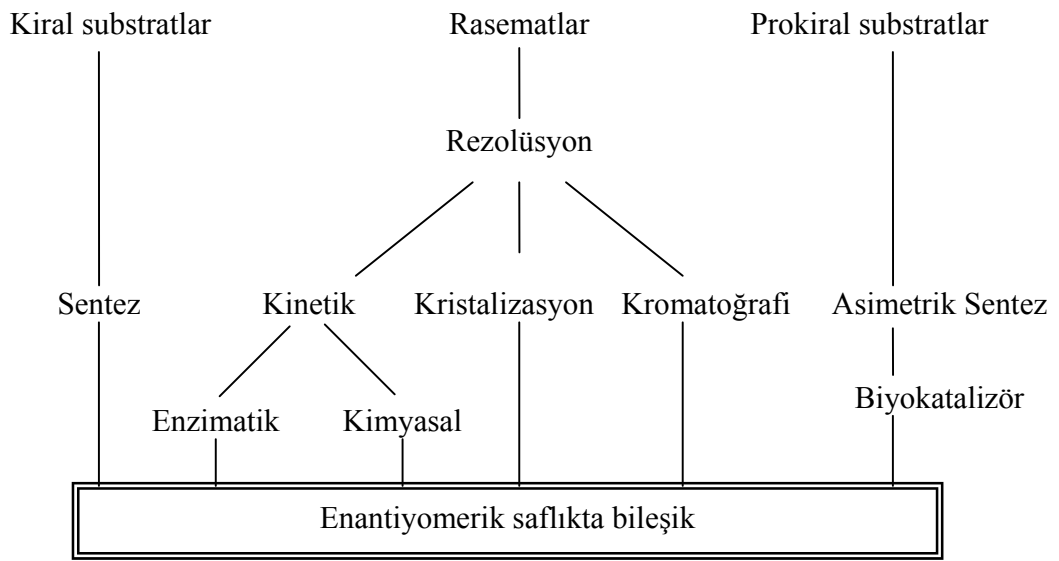
Şekil 2.8 Penisilamin, terpen alkol ve asparajinin enantiyomerlerinin biyolojik etkileri

2.2 Rasemik Karışımların Ayrılması (Rezolüsyon)

Rasemik karışımların enantiyomerlerini ayırmak için enantiyoseçimli enzimler kullanılması bir seçenektir. Kimyasal yöntemlerle bu ayırmanın yapılabilmesi oldukça zordur. İki enantiyomerin birbirinden ayrıldığı ayırma proseslerinde, istenen enantiyomerin maksimum verimi % 50 ile sınırlıdır. Rasemik karışımda istenmeyen enantiyomer rasemizasyonla istenilen enantiyomere dönüştürülür. Hidrolitik enzimlerin çoğu, enantiyoseçimli hidroliz ile rasemik bir karışımın ayrılması sonunda optikçe aktif bileşenlerin elde edilmesinde kullanılmaktadırlar.

2.3 Enantiyomerik Olarak Saf Bileşiklerin Elde Edilmesi

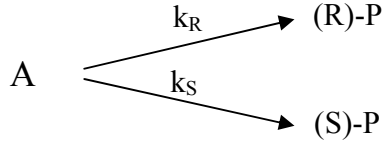
Enantiyomerik saflıkta ($ee > \% 99$) ya da enantiyomerik açıdan zenginleştirilmiş bileşiklerin sentezinde kullanılan metotlar genel olarak başlangıç maddesinin türüne bağlı olarak Şekil 2.9’da gösterildiği gibi üçe ayrılabilir (Ghanem *et al.* 2004) .



Şekil 2.9 Enantiyomerik olarak saf bileşiklerin elde edilmesi

2.3.1 Stereoseçimli sentez

Stereoseçimli sentez, kiral havuz bileşikleri adı verilen kiral başlangıç substratı ve kimyasal ya da biyolojik kiral ayırıcı ve kiral çevre kullanılarak akiral bileşiklerle gerçekleştirilebilir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Stereoseçimli sentez

2.3.1.1 Kiral başlangıç substratı

Doğa optik olarak saf olmasa da optik olarak aktif materyallerin büyük bir kısmını üretir ve buda asimetrik sentez için başlama noktası olarak kullanılır. Alkoloidler, terpenler, şekerler, α -amino- ve α -hidroksi asitler- kiral havuzu oluşturan materyallerdir. Stereoseçimli sentez için kiral havuz yöntemine birçok örnek verilebilir. Örnek olarak (R)-limonen portakal suyu endüstrisinin yan ürünü olarak portakal kabuğundan izole edilir ve nane tadını veren ana bileşen (R)-karvon'un ticari üretiminde başlangıç materyali olarak kullanılır.

2.3.1.2 Kiral ayırıcılar (Kiralite Faktörü)

Rasemik olmayan kiral ayırıcılar stereoseçimli sentezde tepkime ürünlerinde stereoseçimliliği teşvik etmek için kullanılır ve kimyasal ya da biyolojik olabilir. Ayırıcı kiral kısmı kovalent olarak kiral olmayan prokiral substrata bağlanır ve stokiometrik miktarlarda tepkime ortamında olmalıdır. Tepkimeden sonra kiral ayırıcı ortamdaki uzaklaştırıldığında optik olarak aktif ürünler elde edilir ve başarılı bir tepkimede kiral bileşikler yaklaşık olarak % 100 optik saflıkta elde edilebilir.

2.3.1.3 Kiral çevre

Kimyasal tepkime ortamına kiral çözücüler ya da kiral ligand gibi katkıları eklenerek kiral çevre oluşturulur. Kiral çevre tepkimenin diastereomerik geçiş halinin serbest enerjisini değiştirerek iki diastereomerik yolun bir tanesinin gerçekleşmesini sağlar.

2.3.2 Rasematların rezolüsyonu

Rezolüsyon, bir rasem bileşiğin enantiyomerlerine ayrılma işlemidir. Bunun için kristallendirme başta olmak üzere bir takım fiziksel ve kimyasal yöntem geliştirilmiştir.

Rezolüsyonun birçok uygulama alanı vardır. Örnek olarak ilaç olarak kullanılacak bileşik disimetrik bir molekül ise bunun sadece bir enantiyomeri etkindir, diğer enantiyomerin ilaç etkinliği yoktur veya çok azdır. Böyle bir bileşik kimyasal yöntemlerle sentezlendiğinde çoğunlukla rasem şeklinde elde edilir, sonrasında ise rasemik bileşiğin rezolüsyonu yapılarak etkin enantiyomer elde edilir. Enantiyomerlerin rezolüsyonu için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir ve bu yöntemler tercihli kristalizasyon, diasteromerlere dönüştürme, kromatografi ve kinetik rezolüsyon yöntemleri olmak üzere dörde ayrılabilir.

2.3.2.1 Tercihli kristalizasyon

Bu yöntem endüstriyel ölçekli çalışmalarda yaygın olarak kullanılır. Bu proses teknik olarak konglomerat formundaki rasematlarla gerçekleştirilebilir. Konglomerat eşit miktarlarda iki enantiyomerin kristallerinin mekanik olarak karışımıdır. Maalesef tüm rasematların % 20'den daha azı konglomerat olduğundan genelde uygulanabilecek bir yöntem değildir.

2.3.2.2 Diasteromer kristalizasyonu

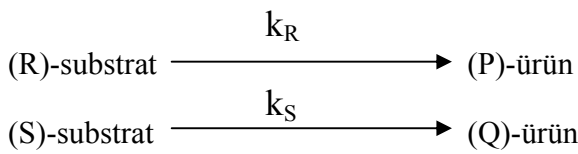
Rasem bileşiğin optikçe aktif bir bazın enantiyomeri ile tuzu oluşturulduğunda artık bu oluşan tuzlar enantiyomer olmayıp diasteromer tuzlardır, dolayısıyla fiziksel özellikleri ve çözünürlük özellikleri birbirinden çok farklıdır. Uygun bir çözücünde kristallendirilerek birbirinden ayrılabilir ve ayrılan tuzlar bir mineral asitle etkileştirilerek asidin anyonu proton alarak serbest hale dönüştürülebilir. Genel olarak, diasteromer tuzlar oluşturmak için kullanılan optikçe organik asitler ve bazlar doğal bileşiklerdir ve türleri oldukça fazladır.

2.3.2.3 Kromatografi

Kolon kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak optikçe aktif katı maddeler (glikoz, sakkaroz, laktoz gibi şekerler) kullanıldığında kolondan rasem bir bileşiğin çözeltisi geçirildiğinde enantiyomerlerden biri diğerinden daha güçlü tutulur ve rezolüsyon gerçekleşir. Kolon uzunluğu yeterli ise toplanan çözeltide sadece bir enantiyomer bulunur. Kolonda tutulmuş olan diğer enantiyomer ise başka bir çözücü ile alınabilir.

2.3.2.4 Kinetik rezolüsyon

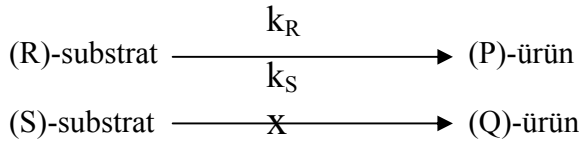
Rasematların rezolüsyonunda kullanılan üçüncü yöntem ise kinetik rezolüsyondur. Bu yöntemin iyi sonuç vermesi kiral girdi ile iki enantiyomerin tepkime hızlarının farklı olmasına bağlıdır. Kiral girdi, biyokatalizör olarak enzim veya mikroorganizma, kimyasal katalizör olarak kiral metal kompleksi, kiral asit ya da baz olabilir ve ortamda katalitik miktarda bulunmalıdır. Rasemik bileşiklerin kinetik rezolüsyonu lipazların katalizlediği dönüşüm tepkimelerinden en yaygın olanıdır ve lipaz enzimi rasemik karışımdaki iki enantiyomer arasında ayırım yapabilir. Dolayısıyla bir enantiyomer diğerinden daha hızlı ürüne dönüştürülür (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 Katalitik kinetik rezolüsyon

$k_R \neq k_S$ olduğu durumda kinetik rezolüsyon gerçekleşir ve tepkime dönüşüm % 0 ila % 50 arasında bir değere ulaştığında durdurulur. İdeal durumda bir enantiyomer diğerinden daha hızlı tepkimeye girer, örnek verilecek olursa tepkime girdisi (R) tepkimeye giren tek enantiyomerdir ($k_S=0$). Bu durumda enantiyomerlerin birbirine oranı 50:50 olduğu rasemik karışımda % 50 dönüşüme ulaşıldığında karışım içinde % 50 girdi (S) ve % 50 ürün (P)

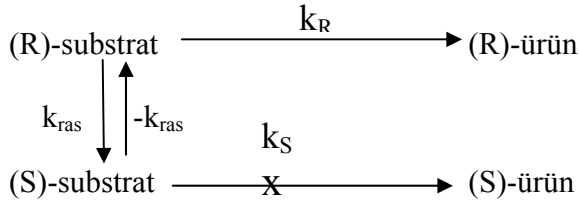
kalır. Bu yöntem tek bir enzim kullanılarak iki enantiyomerin kolay şekilde ayrılmasında avantaj sağlar. Yaygın olarak kullanılan bir rezolüsyon türüdür ve enantiyomerik saflıkta ya da bir enantiyomerce zenginleştirilmiş bileşiklerin elde edilmesinde etkin bir yoldur. Ancak, bu proseste iki enantiyomerin ayrılmasında maksimum % 50 verimle enantiyomerik saflıkta bileşik elde edilebilir (Şekil 2.12). Bu kısıtlama mezobileşikler ve ya da prokiral substratlar kullanılarak, istenmeyen enantiyomerin stereodönüşümü, rasemizasyon ve istenmeyen enantiyomerin geri döndürülmesi ve dinamik kinetik rezolüsyon gibi farklı yöntemler kullanılabilir (Şekil 2.13) (Ghanem *et al.* 2004).



Şekil 2.12 Kinetik rezolüsyon

Dinamik kinetik rezolüsyonda enzim katalizli kinetik rezolüsyon ile rasemizasyon birlikte gerçekleştirilir. Yaygın olarak kullanılan kinetik rezolüsyon ve dinamik kinetik rezolüsyonda (R)-enantiyomeri (S)-enantiyomerinden daha hızlı (R)-ürününe dönüştürülür ($k_R > k_S$) (Şekil 2.12). Dinamik kinetik rezolüsyonun tek farkı (S)- enantiyomeri rezolüsyon prosesi süresince izomerleşir, böylece başlangıç (R,S)- substratının tamamı (R)-ürününe dönüşebilir ve $k_{ras} \geq k_R$ olmalıdır. Maksimum verim % 100 verime ulaşılabilir ve rasemizasyon için kimyasal katalizör olarak asit veya baz kullanılabilir (Ghanem *et al.* 2004).

Enantiyomerik olarak saf ürünlerin elde edilmesinde biyokatalitik üretim, enzimlerin ılımlı koşullarda çalışması, stereoseçimli olmaları ve bozunma izomerizasyon ve rasemizasyon gibi yan tepkimeleri engellemesinden dolayı daha avantajlıdır. Esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini organik ortamda katalizleyebilen lipaz enzimi, endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılır.



Şekil 2.13 Dinamik kinetik rezolüsyon

2.4 Enantiyoseçimlilik

Enantiyoseçimlilik gerçekleştirilen rezolüsyon tepkimesinde enzimin bir enantiyomere karşı diğer enantiyomerden ne kadar fazla seçimlilik gösterdiğinin bir ölçüsü olarak tanımlanabilir. Enantiyomerik aşırılık (ee), Enantiyomerik oran (E) ve % Dönüşüm değerlerinin hesaplanmasında kullanılan denklemler;

Substrat için enantiyomerik aşırılık (Chen *et al.* 1982):

$$\% \text{ enantiyomerik aşırılık } (\% ee_R) = ([R] - [S]) / ([R] + [S]) * 100 \quad (2.1)$$

Dönüşüm (Suginaka *et al.* 1996):

$$x = 1 - ([R] + [S]) / ([R_0] + [S_0]) \quad (2.2)$$

Enantiyomerik oran, E, enantiyomerlerin tepkime hızlarının oranıdır (Rakels *et al.* 1993).

$$E = \frac{\text{Tepkime hızı}_R}{\text{Tepkime hızı}_S} \quad (2.3)$$

Birinci mertebe tepkime için Michaelis Menten sabitleri cinsinden,

$$E = \frac{(V_{maks} / K_m)_R}{(V_{maks} / K_m)_S} \quad (2.4)$$

Tersinmez tepkime için, ee(S), ee(P) ve c'ye bağlı olarak E değerleri:

$$E = \frac{\ln [(1 - x) * (1 - ee(S))]}{\ln [(1 - x) * (1 + ee(S))]} \quad (2.5)$$

$$E = \frac{\ln [1 - x * (1 - ee(P))]}{\ln [1 - x * (1 + ee(P))]} \quad (2.6)$$

ee_S ve ee_P ve x 'e bağılı olarak E değerleri (Faber 2000):

$$E_S = \frac{\ln [(1 - x) * (1 - ee_S)]}{\ln [(1 - x) * (1 + ee_S)]} \quad (2.7)$$

$$E_P = \frac{\ln (1 - x) * (1 + ee_P)]}{\ln [(1 - x) * (1 - ee_P)]} \quad (2.8)$$

2.5 Enzimler

Enzimler canlı hücrelerinde meydana gelen kimyasal tepkimeleri katalizleyen, yani daha hızlı ve daha verimli şekilde gerçekleşmesini sağlayan çoğunluğu protein yapısında olan biyomoleküllerdir.

Enzimler üstün özelliklere sahip olup, tepkimelerin yüksek hızlarda meydana gelmesini sağlarlar. Örnek olarak alkali fosfataz enzimi katalizlediği tepkimeye 10^{17} mertebesinde bir hız artışı getirir (Richard, 2002).

Enzimler biyolojik sistemlerdeki düzenleyicilerdir. Canlı sistemlerde gerçekleşen hemen her tepkime enzimler denetiminde olur. Biyolojik katalizör olarak özetlemek mümkündür. Biyokimyasal tepkimelerdeki stereoseçimliliğin de baş kaynağıdır. Bu nedenle enzimler, organik kimyada asimetrik sentez yaparken de sıklıkla kullanılır.

Enzimler, sıcaklık ve pH değişimlerine karşı çok hassastırlar. Çalışma prensiplerinde üç boyutlu yapıları oldukça önemli olduğundan sıcaklıkla da bu yapı kolaylıkla değiştüğinden dolayı, enzimler genel olarak yüksek sıcaklıklarda inaktif olmaktadır. Buna denaturasyon denir. pH çalışma aralığı enzimden enzime oldukça değiştği için bir şey söylemek daha zordur.

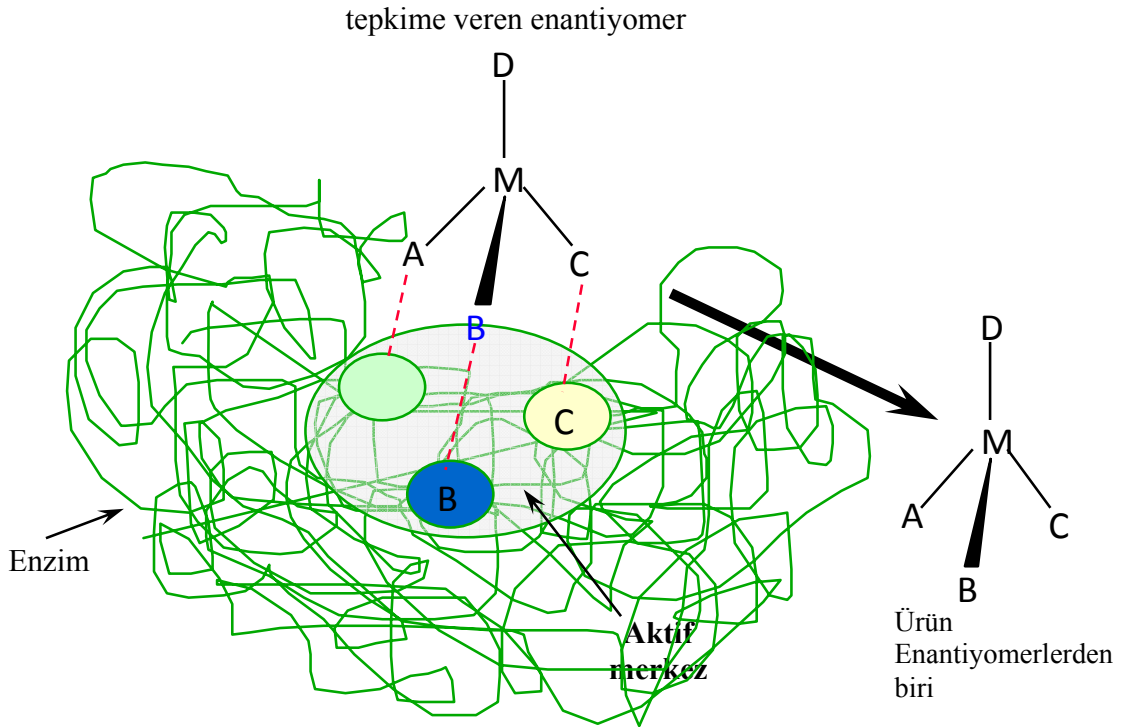
Enzimlerin çalışma mekanizmalarına etki eden en önemli faktörler; sıcaklık, pH'dır. Sıcaklık 10 °C yükseldiğinde tepkime hızı iki misli artar; yani tepkime hızının yükselmesi, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Fakat belirli bir noktadan itibaren düşmeye başlar ve tamamen durur. En iyi çalışabileceği sıcaklığa "Optimum Sıcaklık" denir. Enzimler pH değişimine karşı çok duyarlıdırlar. Genellikle çok fazla asidik ve alkalik ortamda etkisizdirler. Bazı hallerde enzimler en yüksek etkinliği belirli bir pH derecesinde gösterirler. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir.

Farmasotik endüstrisinde enantiyomerik saflıkta bileşenlere ilgiden dolayı biyokatalizörlerin kullanıldığı çalışmalar artmıştır. Enzim ve mikroorganizmaların katalizör olarak kullanılmasının ılıman tepkime koşulları, yüksek bölgesel ve stereo özgüllük ve yüksek tepkime hızı gibi avantajları vardır (Secundo *et al.* 1992). Enzimlerin önemli özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

- Ilımlı tepkime koşullarında çalışırlar. Enzimler, pH 5–8 arasında genellikle 7 ye yakın değerlerde etkilidirler. Enzimler düşük sıcaklıkta, 20–40 °C genellikle vücut sıcaklığı olan 37 °C de tepkimeleri katalizlerler.
- Yan ürün oluşturmazlar. Organik kimyasal tepkimelerde az veya çok yan ürün meydana gelir. Enzim katalizli tepkimelerde yan ürün meydana gelmez, verim % 100 dür. Aksi halde, örneğin milyonda bir bile yan ürün meydana gelse idi, bu zamanla birikerek yaşamın gidişini olumsuz yönde etkileyebilirdi. Bozunma, izomerizasyon, rasemizasyon ve yeniden düzenlenme tepkimeleri kimyasal olarak gerçekleşmez.
- Spesifiktirler. Enzimler sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindir. Molekülü yakın olsa bile bunun dışındaki maddelere karşı etkinlik göstermez.

- Enzim molekülü büyük olmakla birlikte, substrat bunun her yerine değil, ‘aktif merkez’ denilen özel bir yerine bağlanır ve biyokimyasal tepkime orada meydana gelir. Aktif merkezdeki enzim ve substratın geometrileri birbirine uygundur ve aralarında anahtar kilit ilişkisine benzer bir ilişki vardır (Şekil 2.14).

Şekil 2.14’de substrat üzerinde A, B, C şeklinde gösterilen gruplar, enzim üzerindeki uyan oyuklara sadece bir şekilde yerleşebilir. Örneğin kiral bir molekülün sadece R şekli yerleşiyorsa S şekli buraya yerleşemez böylece stereospesifiklik ortaya çıkar (Tüzün 1997).



Şekil 2.14 Enzim aktif merkezinin stereospesifikliği

2.5.1 Enzimlerin yapısı

Tüm enzim proteinleri genler tarafından şifrelenir. Dolayısıyla amino asit dizilimi kendine özgüdür. Bazı enzimler (pepsin ve üreaz gibi) yalnız proteinden oluşmuştur. Fakat diğer çoğunluğu iki farklı kısımdan meydana gelmiştir. Bunlar:

a) Protein Kısmı (enzimin apoenzim kısmı):

Bu kısım enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar.

b) Koenzim Kısmı:

Organik ya da inorganik, genellikle fosfattan meydana gelmiş, protein kısmına göre çok daha küçük moleküllü bir kısımdır. Enzimde işlev gören ve esas iş yapan kısım bu kısımdır. Koenzim kısmı genellikle protein kısmından ayrılabilir ve analizlerinde birçok vitamini bünyesinde bulundurduğu (thiamin, niacin, riboflavin vs.) görülmüştür. Buradan şu genellemeyi yapabiliriz: Bütün vitaminler hücrede enzimlerin koenzim kısmı olarak ödev görürler. Ne koenzim ne de apoenzim kısmı yalnız başına etkindir. Bazı enzimler ortama yalnız belirli iyonlar eklendiğinde etkindirler, örneğin bazı enzim zincirine ancak Mg^{++} iyonu eklenince glikozu laktik aside çevirebilir. Tükürükteki amilaz nişastayı yalnız Cl iyonlarının bulunduğu ortamda parçalayabilir. Canlı bünyesinde bulunan eser elementler, Mn, Cu, Zn, Fe ve diğer elementler bu enzimatik işlevlerde aktivatör olarak kullanılır.

Bazen enzimin iş görebilmesi için bir metal iyonuna gereksinim vardır. Yani koenzim kısmı metal iyonu ise (Ca^{++} , K^{++} , Mg^{+} , Zn^{++}) buna "Kofaktör" denir. Enzimin etkinlik göstermesi için gereksinme duyduğu organik moleküllere "Koenzim" denir. Bazı durumlarda koenzim kısmı apoenzim kısmına kuvvetlice (kovalent) bağlanmıştır; bu sıkı bağlanan kısma "Prostetik Grup"; prostetik grupla apoenzim kısmının her ikisine birden de "Haloenzim" denir.

Enzimlerin bir kısmı sitoplazmaya serbestçe dağılmış olarak, diğer bir kısmı da hücredeki bazı yapılara sıkıca bağlanmış olarak bulunur.

2.5.2 Enzimlerin üç boyutlu yapısına etki eden faktörler

Enzimlerin genel yapısına bakıldığında, hidrofobik alifatik karbon gruplarının enzimin içine doğru yönlendiği, polar grupların ise enzimin dış kısmına doğru yönlendiği görülecektir. Bu da enzimin yapısını belirleyen en önemli etkenin '*hidrofobik etki*' olduğu görülecektir. Bunun dışında metal atomlarıyla enzimin belirli polar grupları arasındaki elektrostatik etkileşimleri eklemek gerekir. Metal katyonları enzimin yapısında büyük roller üstlenir. Ayrıca, enzimin yapısı itibarıyla, enzimi oluşturan atomlar birbirlerine yakın olduğu için, dipol momente sahip komşu gruplar arasında dipol-dipol etkileşimin bulunduğu ve bunun da enzimin yapısına katkı sağladığı bilinmektedir.

Canlı hücrelerde tepkimeler kural olarak 0-50°C; çoğunlukla da 20-42°C arasında meydana gelir. Bu sıcaklıkta tepkimelerin oluşması biyokatalizör denen enzim ya da fermentlerle olur. Bu, aktivasyon enerjisinin düşürülmesi ile olur.

2.5.3 Enzimlerin çalışma mekanizması

Enzimin hangi substratla çalışılacağını saptayan kısmı apoenzim kısmıdır. Apoenzim kısmı ile substrat arasında bir ilişki vardır. Alman kimyacı Emil Fischer tarafından bunun anahtar kilit uyumu gibi olacağı savunulmuştur. Koenzim kısmı daha çok kimyasal bağa yakın olarak işlev gösterir, örneğin ester bağlarını parçalar vs. öyle anlaşıyor ki enzimin apoenzim kısmı bir ya da birkaç yerinden (aktif bölgelerden) substrat molekülüne yapışıyor ya da bağlanıyor (yani bir enzim-substrat kompleksi oluşturuyor) ve bu arada koenzim kısmı substrat üzerindeki bağlarla gerçek anlamda birleşmeye veya bağlanmaya giderek onu parçalıyor. Enzimlerin kimyasal yapıları, özellikle üçüncül yapıları tam olarak bilinmediğinden çalışma mekanizmaları da hala tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır.

2.5.4 Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler katalizledikleri tepkimeye göre altı temel gruba ayrılırlar:

a) Oksidoredüktazlar (EC.1)

Bu enzimler yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini katalizlerler. Substrat üzerinden bir uçtan diğer uca elektron aktarımını sağlarlar. Sistematik adlandırma verici/alıcı oksidoredüktaza göre yapılır. Oksitlenen substrat hidrojen verici olarak kabul edilir ve enzim dehidrojenaz olarak adlandırılır. Moleküler oksijen alıcı ise enzim oksidaz olarak adlandırılır. Alt grupları:

- E.C.1.1 CH-OH bağını etkileyenler
- E.C.1.2 C=O bağını etkileyenler
- E.C.1.3 C-C bağını etkileyenler
- E.C.1.4 C-NH₂ bağını etkileyenler
- E.C.1.5 C-NH- grubunu etkileyenler
- E.C.1.6 NADH veya NADPH ya etkileyenler

b) Transferazlar (EC.2)

Bu sınıfa giren enzimler iki molekül arasında grupların ya da atomların aktarılmasını hızlandırırlar. Sistematik adlandırma, verici/alıcı grup transferaz sınıflandırılmasını izler. Pek çok durumda verici, sıklıkla aktarılan aktif kimyasal grubu taşıyan kofaktör ya da koenzimdir. Alt grupları:

- E.C.2.1 Tek karbon grubu aktaranlar
- E.C.2.2 Aldehit ya da keton grubunu aktaranlar
- E.C.2.3 Açıl transferazlar
- E.C.2.4 Glikosiltransferazlar

E.C.2.5 Alkil ve benzeri grupları aktaranlar

E.C.2.6 Azotlu grupları aktaranlar

E.C.2.7 Fosfor içeren grupları aktaranlar

E.C.2.8 Kükürtlü grupları aktaran enzimler

c) Hidrolazlar (EC.3)

Genel olarak bu tür enzimler ester, eter, peptid, glikozil, asit anhidrit, C-C, C-halojen ya da P-N bağlarının hidrolizini katalize ederler. Bu enzimlerin çoğu deterjan ve gıda endüstrisinde, proteinleri, karbonhidratları ve yağları parçalamak için tepkimelerde kullanılır. Alt grupları:

E.C.3.1 Ester bağını hidroliz edenler

E.C.3.2 Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler

E.C.3.3 Eter bağlarını hidroliz edenler

E.C.3.4 Peptid bağlarını hidroliz edenler

E.C.3.5 Peptid dışında kalan C-N bağlarını hidroliz edenler

E.C.3.6 Asit anhidrit bağlarını hidroliz edenler

d) Liyazlar (EC.4)

Hidroliz dışındaki mekanizmalarla substratdan bazı grupların çıkışını sağlayan enzim türleri bu gruba girer. Alt grupları:

E.C.4.1 C-C bağını bölenler

E.C.4.2 C-O bağını bölenler

E.C.4.3 C-N bağını bölenler

E.C.4.4 C-S bağını bölenler

E.C.4.5 C-halojenür bağını bölenler

e) İzomerazlar (EC.5)

Moleküldeki karbon atomlarının yerlerini değiştiren ya da çeşitli grupları bir karbon atomundan ötekine kaydıran, molekül içindeki geometrik yada yapısal değişimleri katalizleyen enzimlerdir. Alt grupları:

- E.C.5.1 Rasemaz ve epimerazlar
- E.C.5.2 Cis-Trans izomerazlar
- E.C.5.3 Moleküler arası oksido-redüktazlar
- E.C.5.4 Moleküllerarası transferazlar
- E.C.5.5 Moleküllerarası liyazlar

f) Ligazlar (EC.6)

Bu enzimler, ATP'deki ya da ona benzer yapıdaki bileşiklerde bulunan pirofosfat bağının parçalanmasına bağlı olarak meydana gelen enerji sonunda iki bileşiğin birbirine bağlanışını katalizleyen enzimlerdir. Alt grupları:

- E.C.6.1 C-O bağlarını oluşturanlar
- E.C.6.2 C-S bağlarını oluşturanlar
- E.C.6.3 C-N bağlarını oluşturanlar
- E.C.6.4 C-C bağlarını oluşturanlar (Tüzün 1997).

2.6 Lipazlar

Lipazlar, çok çeşitli esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini katalizleyen verimli ve yetenekli enzimlerdir. Yüksek kemo-, stereo- ve bölgesel seçimlilikleri ve ılımlı koşullarda çalışmaları nedeni ile endüstriyel uygulamalarda günden güne daha çok tanınmaktadır (Reetz,1995).

E.C.3.-.-.- Hidrolazlar

E.C.3.1.-.- Ester bağına etki edenler

E.C.3.1.1.- Karboksilik ester hidrolazlar

E.C.3.1.3.3 Triaçilgliserol lipaz

Diğer isimleri:

- Gliserol Ester Hidrolaz
- Triaçil Gliserol Hidrolaz
- Tributiraz

Bu enzimler aynı zamanda mikroorganizmalardan yüksek yapıllı hayvanlara kadar tüm canlılarda yağların biyolojik dönüşümünde anahtar rolü oynarlar. Sindirim enzimi olarak ihtiyaç duyulurlar ve özellikleri sadece yağların bir organizmadan diğerine transfer etmek değil aynı zamanda organizma içinde enerji deposu olan yağların depolanması ve taşınmasıdır (Villeneuve *et al.* 1999).

Organik ortamda esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, susuz ortamda kararlı ve aktif olmaları, kofaktör gerektirmemeleri, yüksek katalitik güçleri, ucuz olmaları, yüksek substrat seçimlilikleri ve yan ürün oluşumunu engellemelerinden dolayı tercih edilirler (Sharma *et al.* 2001).

Lipazlar, stereo ve bölgesel spesifik olmaları nedeniyle kimyasal olarak katalizlenemeyen tepkimeleri katalizleyebilirler (Sharma *et al.* 2001).

2.6.1 Lipazların yapısı

Lipazların yapısı ile ilgili yapılan ilk araştırmalar 1980'lerin ortalarında başlamıştır. İlk olarak *Pseudomonas mendocina* lipazının dizin bilgisine ulaşılmıştır. 1980'lerin sonunda Avrupa'nın desteklediği projeler ile birçok akademik ve endüstriyel laboratuvar yeni lipaz

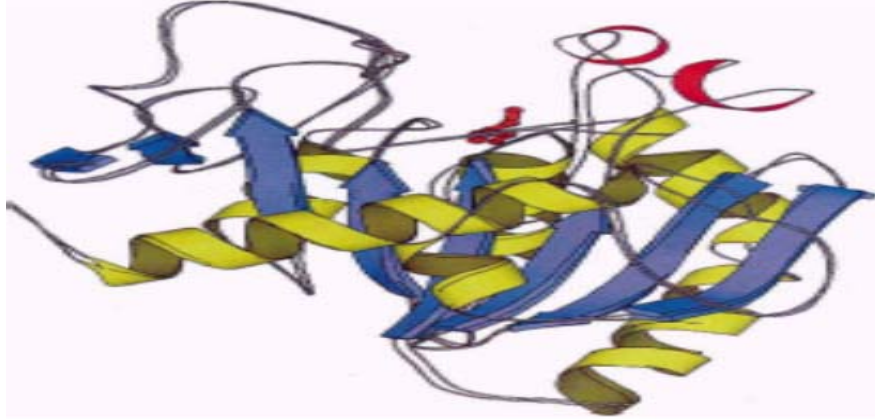
yapılarını çözmeye başlamıştır. Günümüzde birçok lipazın açık ve kapalı konformasyonu bilinmektedir.

Lipazlar α / β hidrolaz ailesine aittirler. Bu ailede lipazların yanı sıra esterazlar, proteazlar, peroksidazlar liyazlar bulunmaktadır (Svendsen 2000).

Lipazların üç boyutlu yapılarının genel özellikleri, merkezde her iki taraftan α -heliksler ile kaplanan hidrofobik β -düzlemidir (α / β hidrolaz katlanması).Ser-his-asp/glu katalitik üçlüsünden oluşan bir aktif konum, bir oksidasyon boşluğu ve pek çok lipazın yapısında karşılaşılan aktif konumu kapatan α -heliksten oluşan bir kapak içermektedir. Katalitik serinin merkezi β -düzlemi üzerinde tam olarak aynı yerde olduğu bununla birlikte, aktif konumdaki Asp / Glu farklı lipazlarda farklı konumlarda olduğu bulunmuştur (Jager *et al.* 1998).

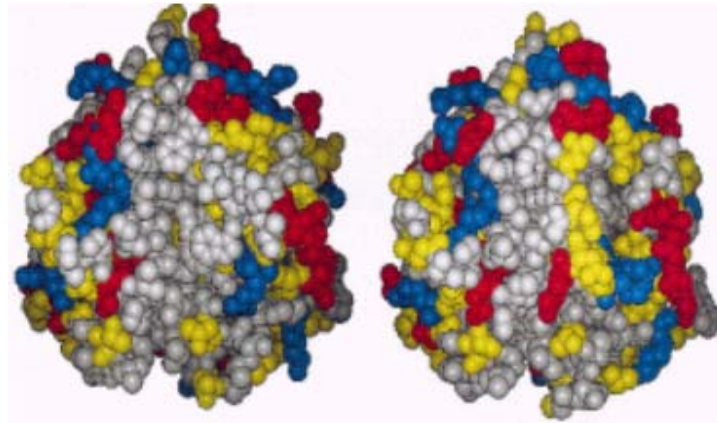
Şekil 2.15 'te *Humicola lanuginosa* kristal yapısı görülmektedir. β - düzlem merkez mavi ile renklendirilmiştir. Sarı renkle belirtilen α -helikslerle sarılı aktif serin merkez ve bu merkezi kapatan kapaklar kırmızıdır.

Lipazlar iki farklı yapısal (konformasyonel) formda bulunabilir. Bunlardan biri lipazın aktif merkezinin tepkime ortamından 'kapak' adı verilen polipeptid zincirle kapatılması sonucu oluşan 'kapalı (inaktif) form' ve kapağın açılması ile aktif merkez ve tepkime ortamının etkileşebildiği 'Açık (aktif) form'. *Humicola lanuginosa* lipazının açık ve kapalı formları Şekil 2.16 'da görülmektedir.



Şekil 2.15 *Humicola lanuginosa* lipazının kristal yapısı (Swendsen 2000).

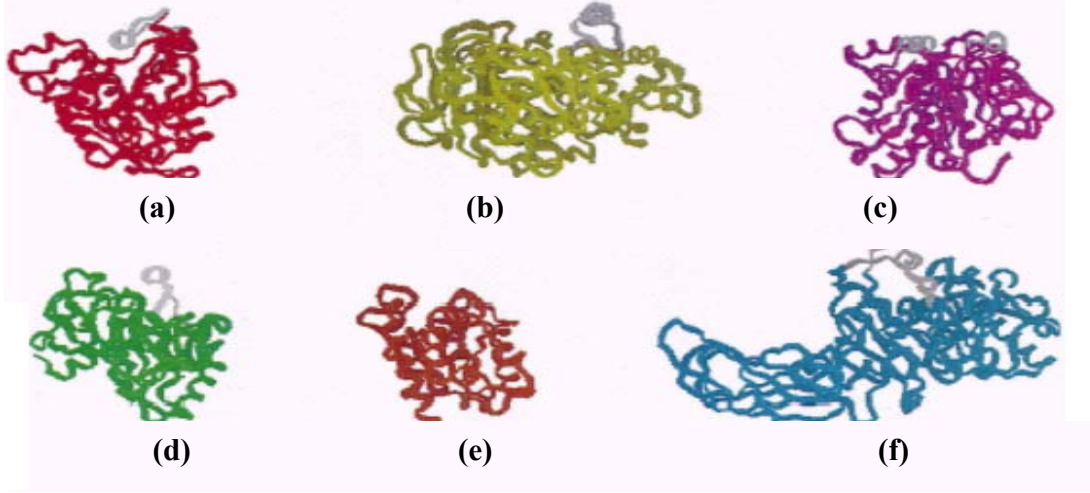
β -plakalı yapılar mavi renkte gösterilmiş ve etrafı sarı renkteki birkaç heliks yapıyla çevrelenmiştir. Aktif serin kısmı kırmızı çubuklar şeklinde, lid (kapak) kısmı ise sarı renkte gösterilmiştir.



Şekil 2.16 *Humicola lanuginosa* Lipaz: a. Açık form b. Kapalı form

(Beyaz)	Hidrofobik kısım	(Sarı)	Hidrofilik kısım
(Mavi)	Pozitif yüklü bölge	(Kırmızı)	Negatif yüklü bölge

Kapaklar birçok lipazın lipid bağlanma bölgesinin merkez kısmında yer alır. Lipaz enzimi için gerekli olan aktivasyon kapak veya kapakların aktif merkez üzerinden hareketi ile olmaktadır. Kapağın yerinden ayrılması lipazın, lipid bağlanma bölgesinde hidrofobik alanın artmasına neden olur. Şekil 2.17’de görüldüğü üzere bazı lipazlarda *C. rugosa* lipazında olduğu gibi kapak birden fazla olabilmektedir.



Şekil 2.17 Bazı lipazların tersiyer yapıları:

a. *Pseudomonas glumae* lipaz , b. *Candida rugosa* lipaz , c. *Candida antarctica* B lipaz , d. *Humicola lanuginosa* lipaz, e. *Fusarium solani pisi* kütinaz , f. İnsan pankreatik lipazının katlanma yapıları. kapak (Lid) kısımları gri renkte gösterilmektedir.

Lipazların üç boyutlu yapılarının genel özellikleri, α/β -hidrolaz katlanması (merkezde her iki taraftan α -heliksler ile kaplanan hidrofobik β -düzlemi), Ser-His-Asp/Glu katalitik üçlüsünden oluşan bir aktif konum, bir oksianyon boşluğu ve pek çok durumda aktif konumu kapatan α -heliksten oluşan bir kapak içermeleridir (Şekil 2.17). Katalitik serinin merkezi β -düzlemi üzerinde tam olarak aynı yerde olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, aktif konumdaki Asp/Glu farklı lipazlarda farklı yerlerde olmaktadır. Katalitik üçlüdeki His ise tüm lipazlarda benzer şekilde diğer iki kalıntıya (Ser-Asp ya da Ser-Glu) bağlıdır (Jaeger and Reetz 1998).

2.6.2 Lipazların kullanım alanları

Lipazlar sahip oldukları özellikler nedeni ile endüstriyel uygulamalarda sıkça kullanılmaktadırlar. Rasemik karışımların rezolüsyonu, yeni yüzey aktif maddelerinin sentezi, farmasötiklerin ve yağların biyodönüşümü ve deterjan katkı maddesi olarak kullanımı bu uygulamalara örnek verilebilir. Lipazların kullanıldığı sektörler ve uygulama alanları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

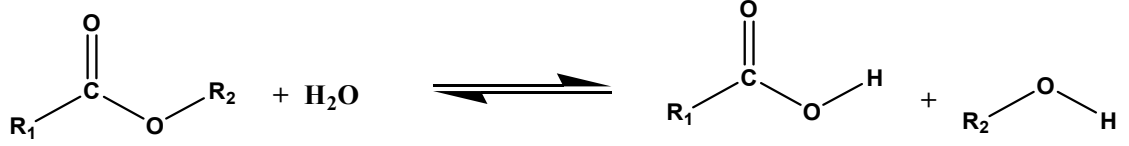
Çizelge 2.1 Lipazların endüstriyel uygulama alanları (Sharma *et al.* 2001)

Endüstri	Tepkime	Ürün / Uygulama
Deterjan	Yağların Hidrolizi	Yağ atıkların uzaklaştırılması
Süt Ürünleri	Süt yağının hidrolizi Peynirin olgunlaştırılması	Süt, peynir ve tereyağda Tat geliştirme
İçki	Aroma geliştirme	İçkiler
Yağ	Transesterleşme Hidroliz	Kakao yağı, Margarin, Yağ asitleri, Gliserol
Et ve Balık	Tat artırma	Et ve balık ürünleri
Kimyasallar	Enantiyoseçimlilik Sentez	Kiral yapı taşları
Farmasötik	Transesterleşme Hidroliz	Sindirime yardımcı özel yağlar
Kozmetik	Sentez	Nemlendirme
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kaliteli kağıt üretimi
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması

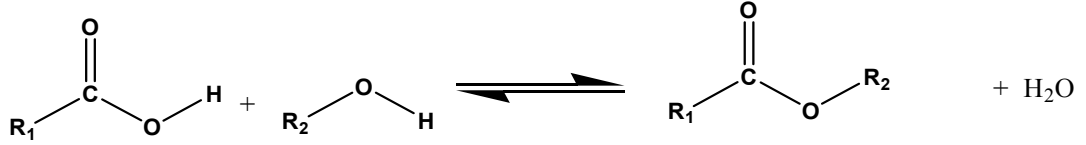
2.6.3 Lipazların katalizlediği tepkimeler

Lipazlar, hidroliz, esterleşme ve transesterleşme tepkimelerini katalizlerler (Şekil 2.18). Transesterleşme tepkimeleri, esterdeki açıl grubu değişimi, bir asit ile yapılıyorsa asidoliziz, alkol kullanılıyorsa alkoliziz, bir başka ester kullanılıyorsa interesterleşme ve bir amin kullanılıyorsa aminoliziz adını alır (Sharma *et al.* 2001).

1. Hidroliz

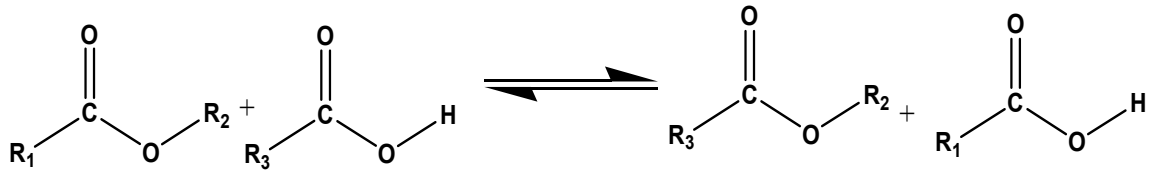


2. Esterleşme

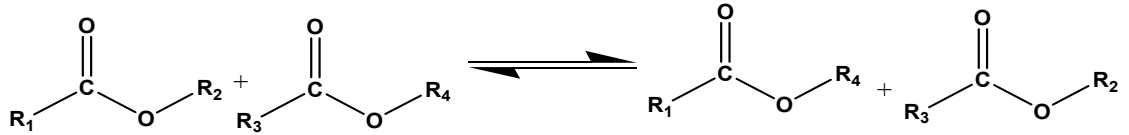


3. Transesterleşme

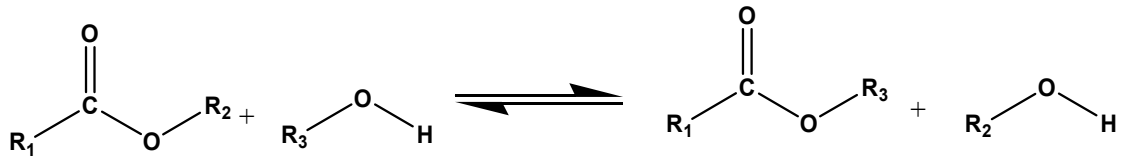
A. Asidoliziz



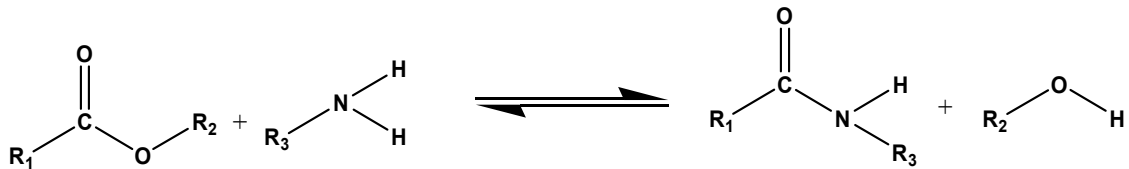
B. İnteresterleşme



C. Alkoliz



D. Aminoliziz



Şekil 2.18 Lipazların katalizlediği tepkimeler

2.7 Tutuklama

Tutuklama, tanımlanmış bir bölgede enzim veya hücrenin katalitik aktivitesini koruyarak fiziksel veya kimyasal olarak hapsedilmesidir. Tutuklanmış biyokatalizörlerin yüksek kararlılık, ürün çözeltisinden kolay ayrılma ve tekrarlı kullanım gibi üstünlükleri bulunmaktadır.

Tutuklama işlemi ile enzimlerin katalitik özellikleri (aktivite, spesifiklik, enantiyoseçimlilik) geliştirilmeye çalışılmaktadır. Organik sentez için lipazların biyokatalizör olarak kullanımı uygun bir tutuklama yöntemi gerektirir.

Tutuklanmış hücreler ile gerçekleştirilen biyotransformasyonlar, serbest hücreler ile gerçekleştirilenlere göre daha kararlı işletme olanağına sahiptir. Tutuklanmış hücreler biyoteknik ortamından kolayca kolaylıkla uzaklaştırılabilir ve tekrar kullanılabilirler. Tutuklanmış biyokütle ortamda tutulabiliyorsa biyotransformasyon sürekli olarak gerçekleştirilebilir. Ürün oluşum hızı yüksektir ve inhibisyon etkisi minimumdur. Böylece biyokatalizörün kararlılığı ve maksimum etkinliği korunur. Tutuklamanın ek maliyet getirmesi ve difüzyon kısıtlamaları bu yöntemin dezavantajlarındandır.

2.7.1 Tutuklama yöntemleri

Tutuklama yöntemleri dört ana başlık altında toplanabilir:

1. Çapraz bağlama
2. Taşıyıcıya bağlama
 - ✓ Fiziksel adsorpsiyon
 - ✓ İyonik bağlama
 - ✓ Metal bağlama
 - ✓ Kovalent bağla

3. Hapsetme

- ✓ Jel içinde hapsetme
- ✓ Lif içinde hapsetme
- ✓ Mikrokapsülleme

4. Ultrafiltrasyon membran reaktör

Tutuklama yöntemi belirlenirken; tutuklanacak olan enzimin özellikleri, gerçekleştirilecek olan tepkime ve tepkime koşulları ile eğer kullanılıyorsa destek özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır. Kullanılacak olan destekte aşağıda belirtilen özelliklerin olması istenir:

- Geniş yüzey alanı
- Geçirgenlik
- Kimyasal, mekanik ve ısı kararlılık
- Yüksek dayanım gücü
- Uygun şekil ve gözenek çapı
- Mikrobiyal kuvvetlere karşı direnç
- Yenilenebilirlik

Tutuklama matrisleri de organik ve inorganik matrisler olmak üzere iki ana alt gruba ayrılır:

1- Organik Matrisler

1.1- Doğal Polimerler:

1.1.1- Polisakkaritler: Selüloz, Nişasta, Dekstran, Agar, Alginat, Carragenan

1.1.2- Polimerler: Kollajen, Jelatin, Albümin

1.2- Sentetik Polimerler:

Polistiren, Poliakrilat türleri

2- İnorganik Matrisler

2.1- Mineraller:

Bentonit, Kieselgur

2.2- Fabrikasyon maddeler:

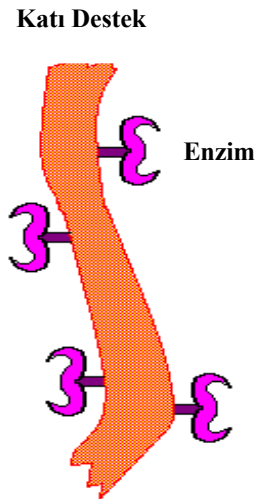
Gözeneksiz cam, Gözenekleri kontrollü cam, metaller, gözenekleri kontrolsüz metal oksitleri olabilir (Takaç 2003).

Bir enzim bir yüzeye tutuklanacağı zaman en önemli olan konu enzimin kimyasal doğasını ve bağlanma noktalarındaki reaktif grupları değiştirmemek, aktivite kaybına sebep olmamaktır. Diğer bir deyişle enzime mümkün olan en az zararı vererek tutuklamaktır. Bağlama sırasında enzimin aktif konumları ile tepkime verdirmekten kaçınılmalıdır. Alternatif olarak aktif bölgeyi korumak amacı ile ortama koruyucu gruplar eklenir. Bazı durumlarda koruma fonksiyonunu enzimin substrat molekülleri veya yarışmalı inhibitörleri üstlenir. Enzimin tutuklamadan sonraki yapısı tutuklama yüzeyine bağlıdır. Burada oluşan hidrojen bağları veya elektron geçiş kompleksleri oluşabilir. Bu bağlar enzimin vibrasyonunu önler ve termal kararlılığı artırır.

2.7.1.1 Taşıyıcıya bağlama

Kullanılan en eski tutuklama yöntemidir (Şekil 2.19). Taşıyıcıya bağlı enzim miktarı ve tutuklamadan sonra enzim aktivitesi, taşıyıcının yapısına bağlı olarak değişir.

Taşıyıcının seçiminde enzim yapısının yanı sıra; parçacık çapı, yüzey alanı, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı, kimyasal bileşim de önemlidir. Genel olarak, hidrofobik grupların ve tutuklu enzim derişiminin artışı ile aktivitenin arttığı gözlenmiştir.



Enzim tutuklamada sıklıkla kullanılan taşıyıcılar; selüloz, dekstran, agaroz ve poliakrilamid jel gibi polisakkarit türevleridir.

Taşıyıcıya bağlama metodu, enzimin bağlanma cinsine göre dört alt sınıfa ayrılır:

- ✓ Fiziksel adsorpsiyon
- ✓ İyonik bağlama
- ✓ Metal bağlama
- ✓ Kovalent bağlama

Şekil 2.19 Katiya bağlama

(a) İyonik bağlama

İyonik bağlama metodu, enzimin suda çözünmeyen ve iyon değiştirici parçalar içeren taşıyıcı ile iyonik bağ ile bağlanmasıdır. Polisakkaritler ve sentetik polimerlerden, iyon değiştirici merkezler içerenler taşıyıcı olarak kullanılırlar.

Enzimin taşıyıcıya bağlanması kolay gerçekleşir. Koşullar kovalent bağlamaya oranla daha ılımlıdır. İyonik bağlama metodu enzimin konformasyonunda ve aktif bölgelerinde değişime neden olur. Bu nedenle birçok durumda enzimin aktivitesinde artış gözlenir. İyonik bağlamanın diğer yöntemlerden farkı enzim ve destek arasındaki bağlanma kuvvetlerinin fiziksel adsorpsiyondan düşük, kovalent bağlamadan yüksek olmasıdır.

(b) Kovalent bağlama

Yöntem, enzim ile suda çözünmeyen destek arasında kovalent bağ oluşturulması esasına dayanır. Bir proteinin taşıyıcıya tutuklanmasını sağlayacak olan tepkime seçilirken, dikkat edilmesi gereken iki önemli nokta vardır.

1. Tepkime enzimin aktivite kaybına uğramayacağı koşullar altında gerçekleştirilmelidir.
2. Enzimin aktif bölgesi, kullanılan reaktifler ile etkileşmemelidir.

Bağlamada kullanılan fonksiyonel gruplar; amino, karboksil, sülfhidril, hidroksil,imidazol, fenolik, tiol, tirionin ve indol gruplarıdır.

Kovalent bağlama ile tutuklama işleminde koşullar biraz daha karmaşık ve fiziksel adsorpsiyon ve iyonik bağlama yöntemlerinden daha az ılımlıdır. Bu nedenle kovalent bağlama, enzimin aktif bölgesini etkileyerek aktivitede düşüşe sebep olabilir. Buna karşın enzim ve destek arasındaki bağ çok kuvvetlidir ve yüksek iyonik güce sahip çözelti veya substrat varlığında bile enzim sızması olmaz.

Destek matrise kovalent bağlama enzimin katalitik etkisini engellemeyecek fonksiyonel grupları içerir. Daha yüksek aktiviteler aktif kısmın amino asit parçaları ile inaktivasyon tepkimelerinden korunarak elde edilir. Koruyucu metotlara örnek olarak;

- Enzimin substrat veya yarışmalı inhibitör varlığında kovalent bağlanması
- Kovalent bağlı tersinir enzim – inhibitör kompleksi oluşturmak
- Kimyasal olarak modifiye edilmiş ve üzerine yeni gruplar eklenmiş olan enzimin bağlanması verilebilir.

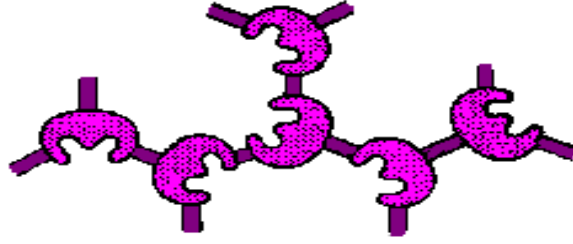
Bu durumlarda enzimin bağlanması aşağıda sıralanan şekillerde olabilmektedir.

- Diazolama: DESTEK—N=N—ENZİM
- Amid bağ oluşumu: $\text{DESTEK—CO—NH—ENZİM}$
- Alkilasyon ve Arilasyon: $\text{DESTEK—CH}_2\text{—NH—ENZİM}$
 $\text{DESTEK—CH}_2\text{—S—ENZİM}$
- Schiff'in baz oluşumu: DESTEK—CH=N—ENZİM
- Amidasyon tepkimesi: $\text{DESTEK—CNH—NH—ENZİM}$
- Tiyo-disülfid değişimi: DESTEK—S—S—ENZİM

Kovalent bağlı enzimlerin kararlılığı artar ve enzimler çözeltiye dağılmaz. Ayrıca birçok bağlanma tepkimesi ve taşıyıcı çeşidi mevcuttur. Bu durum da kovalent bağlamayı genel olarak tercih edilen bir yöntem haline getirmektedir.

2.7.1.2 Çapraz bağlama

Çapraz bağlama, proteinin bir başka protein veya destek matrisi üzerinde bulunan fonksiyonel gruplarla moleküller arası bağlar oluşturması ile gerçekleştirilir (Şekil 2.20). Pahalı bir metot olması ve düşük aktivite ile sonuçlandığı için, genel olarak başka bir yöntemle birlikte kullanılır.



Şekil 2.20 Çapraz bağlama

Adsorplanmış enzimin kararlılığı ve poliakrilamid jelden, enzimin sızmasının önlenmesi için kullanılır. En çok kullanılan çapraz bağlama materyali glutaraldehitdir. Bu metod sert koşullar altında gerçekleştirilir ve enzimin aktif bölgesinde meydana gelen konformasyon bozukluğu nedeni ile aktivite kaybı gözlenebilir.

2.7.1.3 Hapsetme

Hapsederek tutuklama metodu, enzimin polimer matris veya membran içine konumlandırılması esasına dayanır. Enzim matris içinde tutulurken substrat giriş çıkışı mümkündür. Kafes ve mikrokapsülleme olmak üzere ikiye ayrılır. Bu iki tür Şekil 2.21’de görülmektedir.



Şekil 2.21 a. Kafes tipi çapraz bağlama, b. Mikrokapsülleme

Çapraz bağlama metodunda enzim matris ile bağ oluşturmaz. Fakat kimyasal polimerleşme tepkimeleri sert koşullar altında gerçekleştirildiği için aktivite kaybı, bu yöntemde de söz konusudur. Bu kaybı en aza indirmek için enzimin çeşidine göre tepkime ve tepkime koşulları belirlenmelidir (<http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/methods>, 2006).

2.7.2 Tutuklama işleminin sağladığı avantajlar ve dezavantajlar

Tutuklama işleminin avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir.

- ✓ Aktivitelerini serbest haldekinden daha fazla korurlar
- ✓ Kesikli reaktörlerde defalarca, sürekli reaktörlerde uzun süre kullanılabilirler
- ✓ Ürün çözeltilerinde ayrılmaları kolaydır
- ✓ Kullanımları ekonomiktir
- ✓ Farklı enzimlerin bir arada tutuklanması sağlanarak ardışık ve paralel tepkimelerde kullanılabilirler.

Tüm avantajlarına rağmen bazı dezavantajlar da mevcuttur. Bu dezavantajlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Tutuklama sırasında aktivite kaybı görülebilir.
- İlave tutuklama masrafı
- Tutuklama materyali geri kazanılamaz
- Difüzyon kısıtlamalarıdır.

Alcaligenes sp. Lipaz QL enzimin katalitik özelliklerini arttırmak için farklı desteklere kovalent bağlama ve hidrofobik destekler üzerine adsorpsiyon ile tutuklama işlemleri uygulanmıştır. Tutuklama işlemleri enzim üzerinde çok ilginç gelişmeler sağlamıştır.

- a) Enzim tutuklamadan sonra hiper aktive (aktivite > %100) olmuştur.
- b) Termal kararlılık oldukça artmıştır.
- c) Optimal sıcaklık artmıştır,
- d) Glisidil bütiratın hidroliz tepkimesinde enantioseçimlilik artmıştır ve enantioseçimliliğin deney koşullarına bağlılığı azalmıştır.

Ayrıca yüksek hidrofobikliğe sahip desteklerde enzim, tersinir fakat çok güçlü adsorbe olduğundan; lipaz inaktif olduğunda desorpsiyonla destek geri kazanılıp tekrar kullanılabilir. Adsorpsiyon lipazın hidrofobik destek üzerine arayüzey aktivasyonu ile çok

düşük iyonik kuvvetle tutunması ile gerçekleşir. Diğer yandan kovalent bağlama ile yöntemleri, lipaz özelliklerini güçlkle iyileştirmiştir (Wilson, 2005).

Tutuklu enzim, sıcaklık ve pH derişimlerinde daha yüksek kararlılık göstermiştir. Ayrıca yüksek başlama hızı ve enantiyoseçimlilik gözlenmiştir (Panzavolda *et al*, 2004).

2.8 Enzimatik Tepkimelerde Su Etkisi

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

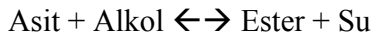
Enzimler ortamda hiç su olmaması durumunda aktivite gösteremezler. Oysa katalitik olarak aktif olması için, bir enzimin gereksinim duyduğu su miktarı oldukça düşüktür (Zaks and Klivanov 1984, 1985). Susuz sistemlerde, enzimin katalitik olarak aktif formunu koruması için gereken su miktarı, enzim molekülü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

Biyokatalizör aktivitesindeki değişme genellikle tüm tepkime karışımının su içeriğinin fonksiyonu olarak verilir. Bu durumda su içeriği sabit, diğer parametreler değiştirilmektedir. Tepkime sistemlerinde iki ya da daha fazla fazların olması, bu fazların her birinin bir miktar su içermesi ve bu fazlar arasında suyun dağılması nedeniyle parametre olarak toplam su içeriği bilgi verici değildir. Bir miktar su biyokatalizör etrafında

daha polar bir fazda bulunurken (seyreltik sulu çözelti oluşturabilir), bir miktar su da organik fazda tek tek moleküller ya da küçük oligomerler olarak çözünür. Fazların bileşimini değiştirmeksizin bağıl (relatif) hacimlerindeki değişimler, toplam su içeriğini etkileyecek, biyokatalizörün mikro çevresini ya da biyokatalizör davranışını etkilemeyecektir. Bu durumda optimum aktivite (ya da diğer özellikler) için kritik su içeriğinin, enzim, destek ya da çözücü değiştirildiğinde değişmesi beklenir (Valivety *et al.* 1992a, b, Halling 1994).

Zaks and Klivanov (1988), sistemdeki toplam su içeriğinden çok enzime bağlı olan suyun katalitik aktiviteyi belirlediğini açıklamışlardır. Değişik organik çözücüleri (kritik toplam su içerikleri oldukça farklı olan), içeren sistemlere aynı miktarda su eklendiği zaman enzimle birleşen su miktarı değişmiştir. Daha polar çözücüler daha fazla su çözünürlüğüne ve daha yüksek kritik su içeriklerine sahiptirler. Bu çözücüler enzimden "temel suyu sıyırma" için daha fazla eğilime sahiptirler. Genellikle daha polar çözücü daha fazla suyu çözeltide tutacak ve böylece su enzime bağlanmak için kararsız olacaktır. Enzim tarafından bağlanan su sistemdeki su aktivitesi a_w 'nin fonksiyonudur (Valivety *et al.* 1992a, 1992b, Halling 1994).

2.8.1 Lipaz katalizli esterleşme tepkimelerde su aktivitesi (a_w)



Esterleşme tepkimeleri sırasında oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılması ile verim artırılabilir. Literatürde suyun uzaklaştırılması ile ilgili olarak, üst boşluktan boşaltma (headspace), "pervaporation", tuz hidratları, doymuş tuz çözeltileri, adsorpsiyon, tepkime ortamından inert gaz geçirilmesi gibi çeşitli yöntemler yer almaktadır. Bu yöntemler hidroliz tepkimelerini tersine döndürmek için kullanılmaktadırlar. Bunun yanı sıra, sistemin su aktivitesi ortamdan suyun uzaklaştırılmasına gerek kalmadan belli bir seviyede de tutulabilir (Rosell *et al.* 1996).

2.8.2 Su aktivitesi

Su aktivitesi; termodinamik ve fizikokimyanın temel prensiplerinden türetilmiş bir kavramdır. Aynı sıcaklık ve basınçta saf suyun $a_w = 1$ olarak tanımlanan değerine göre bağlı olarak tanımlanır. Gaz fazda a_w zorunlu olarak kısmi nemliliğe eşittir. Yani suyun belli bir sıcaklıkta üzerinde bulunan su buharına ait kısmi basıncının, aynı sıcaklıkta saf suyun buhar basıncına oranıdır.

Termodinamik bir aktivite olarak suyun dengeye ulaştığı tüm sistemler için tüm fazlarda su aktivitesi eşittir. (denge halinde katı-sıvı-gaz fazda eşittir). Organik fazda ve katalizörlü tepkime ortamlarında bu özellikten çokça yararlanılır. Uygun ölçüm metotlarına bağlı olarak denge halinde genellikle gaz fazdan ölçüm yapılır. Bu nedenle temel olarak organik ortamda a_w 'nin ölçülmesi her fazda derişim belirlemesinden daha kolaydır. Su aktivitesinin daha da kullanışlı bir özelliği de suyun dahil olduğu herhangi bir kimyasal dengede suyun kütle etkisini belirlemesidir.

Termodinamik bir prensip olarak su aktivitesinin tanımlanabilmesi belirli sıcaklıkta saf su ($a_w = 1$) sisteminin dengede olan standart durum tanımlanmalıdır (Halling 1994).

Denge durumunda;

$$\mu = \mu_0 + RT \ln (f/f_0) \quad (2.10)$$

Burada μ ;(J/mol), bir mol maddenin termodinamik aktivitesi veya enerjisi olarak tanımlanan, sistemin kimyasal potansiyelidir. Eşitlik (2.10)'deki diğer parametreler olan μ_0 , T ($^{\circ}$ K) sıcaklığında saf materyalin kimyasal potansiyelini, R, ideal gaz sabitini (8.314 J/molK) ve f de fugasiteyi göstermektedir.

Susuz ortamdaki su ilişkileri derişimle değil, termodinamik su aktivitesi (a_w) ile daha iyi açıklanabilir. Saf su için $a_w = 1$ dir. a_w değeri 0-1 aralığında değişir. Bir tepkime karışımında,

fazların su derişimlerinin genellikle farklı olmasına karşın tüm fazların a_w değerleri dengede aynı olacaktır.

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

Su aktivitesi aşağıdaki eşitlik (2.9) ile verilir.

$$a_w = \gamma_w X_w \quad (2.9)$$

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

2.8.2.1 Su aktivitesinin ölçülmesi

Tepkime ortamındaki a_w 'nin ölçümünde; nem sensörleri ($a_w = P_i / P_i^\circ$, P_i suyun kısmi basıncını, P_i° ise saf suyun aynı sıcaklıktaki doymuş buhar basıncını gösterir), su derişimi - a_w arasındaki kalibrasyon grafiği ve buhar-sıvı denge verileri kullanılabilir. Su aktivitesi kullanımının avantajları aşağıda sıralanmıştır (Kapucu, 2003).

1. Tüm fazlarda (katı, sıvı ve gaz) a_w değerinin aynı olması nedeniyle tüm sistemin su aktivitesi, en uygun olan fazda belirlenebilir. Gaz faz için su sensörleri kullanılabilir.

2. Çözücü ve enzim arasındaki su dağılmasının indirekt etkileri ortadan kaldırılır.
3. Hidrolitik dengeye suyun kütle hareketi etkilerini belirler.
4. Çözücü, substrat, destek ve enzim derişiminin değıştirilmesi ile, bağlanan su miktarı ile enzim aktivitesi ve tepkime hızı tahmin edilebilir.
5. Deney düzeneği, su aktivitesini ya da derişimini ölçmek için uygun olmadığında, kullanılan a_w değerini sabit tutan yöntemler (doğun tuz çözeltisi ya da hidrate tuz çifti) kullanılabilir.
6. Seyreltik sulu fazın olup olmadığını gösterir.
7. Dengedeki gaz fazın bağıl nemi ile ölçülebilir ve kontrol edilebilir.

2.8.3 Su aktivitesinin (a_w) ayarlanması ya da kontrol edilmesi

Organik ortamda su aktivitesini kontrol etmek amacı ile birkaç yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birçoğu iyi tanımlanmış bir su aktivitesi değerine sahip olan bazı tuzların sabit bir hidratlanma seviyesine sahip olmasıdır (Wehtje *et al.* 1994). Bazı tuzlara ait belirli sıcaklıklarda su aktivitesi değerleri Ek 1’de verilmiştir.

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

- Membran reaktör kullanılması ve "pervaporation"
- Tepkime ortamına ön dengeye getirilmiş olan silika jel eklenmesi
- Kuru gaz (azot) geçirme (sparging)
- Su tamponu olarak görev yapan tuz hidratlarının kullanılması (a_w 'nin sürekli kontrolü)

- Doygun tuz çözeltileri ile her iki fazın ön dengeye getirilmesi (başlangıç a_w değerinin ayarlanması) ya da tepkime ortamına daldırılan bir silikon tüp içinden doymuş tuz çözeltilerinin geçirilmesi ile (a_w 'nin sürekli kontrolü).
- a_w sensörlerinin kullanılması ile reaktörün üst boşluğundan kontrollü kurutma

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

2.8.3.1. Tuz çiftleri kullanılarak a_w kontrolü

Kuhl *et al.* (1981) organik ortamda yürütülebilen chymo-trypsin katalizli tepkimesine suyun sadece tuz hidratlarının yapısında ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) ilave edilmesi ile gerçekleştiğini göstermişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise tuz çiftleri kullanarak su aktivitesi gibi önemli bir parametre kontrol edilebilmiştir. İleri aşamalarda farklı tuz çiftlerinin de tepkime ortamının a_w değerini kontrol etmede başarılı olduğu görüldü (Kuhl and Halling 1991). Bu yöntemin a_w 'yi sabitlemede ve kontrol etmede kullanışlı bir yöntem olduğu görülmüştür. Farklı tuz çiftleri çeşitli, proteazlar (Kuhl *et al.* 1991, 1992), lipazlar (Kvittingen *et al.*

1992), ve oksidazlar (Yang *et al.* 1992) ile çalışılmıştır. Su aktivitesinin kontrolünde kullanılan bu yaklaşım amaçları sentez olan ve enzimatik tepkime uygulamaları yapan bu araştırmacılara yararlı olmuştur. Bu alandaki birkaç çalışmacı a_w kontrolü amaçlı uygun tuz çiftlerinin belirlenmesinde çalıştı. Yapılan bu çalışmalardan elde edilen veriler derlenerek tablo halinde verilmiştir (Halling 1994).

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



Hidrate tuz çiftinin fazla su içeren formu suyu salıverme, düşük su içeren formu ise suyu tutma eğilimindedir. Su aktivitesi tuzun türüne ve sıcaklığa bağlı olarak kontrol edilebilir, ancak çözücünden bağımsızdır (Kapucu,2003).

Sabit bir a_w elde edebilmek için prensipte her iki ilgili tuz formunun sistemde aynı anda bulunduğundan emin olmak gereklidir. Fakat bunu temin etmek için her iki hidrat formunu tepkime ortamına ayrı ayrı eklemek gerekli değildir. Eğer yüksek hidrat formu sisteme başlangıçta eklenirse a_w değerinin dengeye gelmesi için bu form sisteme su verir. Benzer olarak anhidrit formu veya daha düşük hidratlı form, başlangıçta daha yüksek a_w değerine sahip sisteme eklenirse, ortamdan su çekerek partner hidratını oluşturur. Ayrıca gerekli olan hidrat karışımını oluşturmak için bir formu uygun nemlilikte olan atmosfere maruz bırakarak oluşturmak da elverişli bir yöntemdir. Bu uygulamada değişen nemliliğe ve sıcaklığa dikkat edilmelidir (Halling,1994).

Tuz hidratların genel dağılıma davranışı şöyle açıklanabilir;

İdeal olarak katı fazın kimyasal potansiyeli ya da aktivitesi bulunan miktardan bağımsızdır. Karakteristik su buhar basıncı, eğer tuzlar ideal davranırsa, aynı tuza ait iki hidrat formunun dengesinden bulunabilir. Burada tuzların oranı önemli değildir. Özenle kurutulan tuz düşük su basıncı vermektedir. Kendine ait bir buhar basıncı olan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve anhidrat oluşturabilmek için az miktarda suya ihtiyaç vardır. Bu buhar basıncı tüm tuz $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hidratı olana kadar sabit kalır. Su miktarı artırılıp $2\text{H}_2\text{O}$ hidratı ile yeni oluşan $7\text{H}_2\text{O}$ hidrat karışımı oluşmaya başlayınca buhar basıncında ani bir artış gözlenir. Bu konu ile ilgili birkaç sistem etraflıca incelenmiştir. Sonuç olarak diğer tuzlarla ideale yakın davranış gözlenmiştir (Gmelin Institut, 1928-1973).

Su buharı basıncının sabit olduğu (yani belli miktarda su içeren ortamların su buhar basınçları belli bir aralıkta çıkıyor), her düzey bölümü sabit bir a_w değeri ile ilişkilendirilmiştir. Bu değer buhar basıncının, aynı sıcaklıktaki saf suyun buhar basıncına bölünmesi ile elde edilmektedir. Sıcaklığın artması ile hem saf suyun hem de hidratın buhar basıncı artmaktadır. Hemen hemen her durumda yükselme hızı hidratlarda daha yüksektir. Bu nedenle a_w de yükselmektedir. a_w tamponu için tuz hidrat çifti seçilirken sıcaklığa göre dikkatlice seçilmelidir. Doygun tuz çözeltilerinde a_w nin sıcaklıktan etkilenme ihtimali daha düşüktür. Bunun nedeni belki de çözünürlüğünde sıcaklıkla artmasıdır. Birçok tuz hidratı için maksimum bir sıcaklık değeri vardır ve bu değer üzerinde tuzlar kararlı değildir. Bazı tuz hidrat sistemleri açıkça ideal olmayan davranış gösterebilirler. Bu da onları a_w 'yi sabitleme uygulamalarında kullanışsız kılar. İdeal olmayan davranışın nedenleri aşağıdaki maddelerle özetlenebilir:

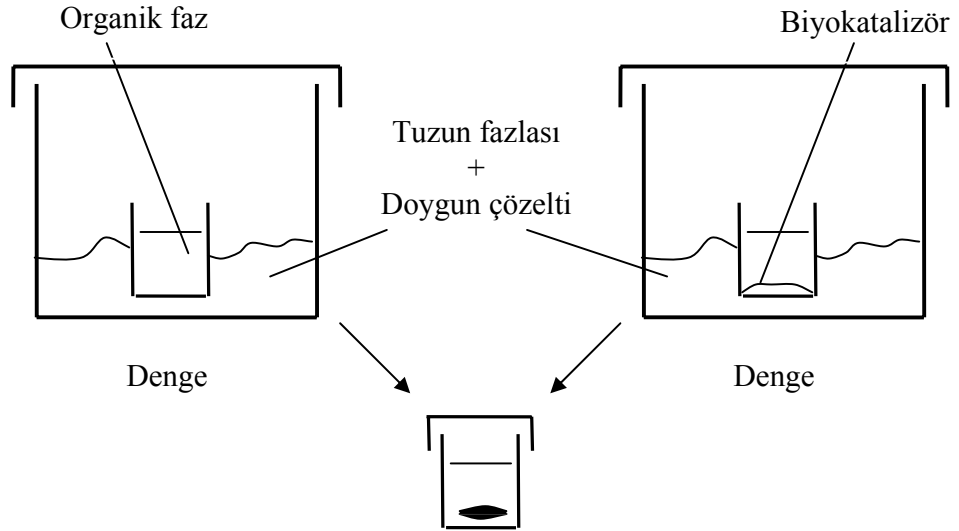
1. Buhar basınçları su içeriğine bağlı olarak değişiklik gösterir. Bunun başlıca nedeni katı solüsyonların oluşmasıdır.
2. Kristal boyutunun ve /veya şeklinin belirgin etkisinin olması. Bu durum genellikle geniş yüzey alanına sahip tozlarda (powder) ortak olarak gözlenmektedir.
3. Geçiş hidratlarının (intermediate) metastabilitesi veya kristal formları
4. Dengenin oluştuğu yönde elde edilen son buhar basıncına bağlılık

Dengede bulunan a_w değeri doğru olsa bile, ulaşılan hız yeterli olmayabilir. Bu hızın belirlenmesi zordur ve kristal boyutuna, şekline ve yüzey karakteristiklerine bağlıdır. Enzim tepkimelerinde genellikle hızlı görünürler fakat fakat iki durumda daha yavaş ilerleyebilirler:

- Mükemmel yakın kristallerin iki hidrat formundan birinin dönüşümü yavaştır. Böyle durumlarda tepkime ortamına eklemekten önce diğer formu oluşturmada fayda vardır.
- Düşük a_w değerlerine sahip hidratların hızı daha yavaştır.

2.8.3.2 Doygun tuz çözeltileri ile a_w kontrolü

Başlıca organik sistemlerde başlangıç hızı çalışmalarında a_w 'nin sabit tutulması basit bir yöntem olup ilk olarak Goderis *et al.* (1987) tarafından uygulanmıştır (Şekil 2.22). Bu yöntemde organik ortam ve katalizör, kullanılmadan önce buhar fazla ön dengeye getirilmektedir. Fakat tepkime sırasında açığa çıkan ya da harcanan su olduğu durumlarda önceden belirlenen a_w değeri değişmektedir (Khan *et al.* 1993).



Şekil 2.22 Doygun tuz çözeltileri ile organik faz ve biyokatalizörün sabit a_w değerinde ön dengeye getirilmesi

a_w 'nin sürekli olarak kontrolü için ayrı bir yöntem, doymuş tuz çözeltisinin tepkime ortamına daldırılmış olan silikon tüp yardımıyla tepkime kabı boyunda sirküle ettirilmesidir (Wehtje *et al.* 1997b). Tepkime ortamında oluşan su, tüp duvarı boyunca difüzyonla uzaklaşır ve böylece kullanılan tuz çözeltisinin a_w değerinde denge sağlanır (Şekil 2.23).



Şekil 2.23 Doymuş tuz çözeltileri ile sürekli a_w kontrolü (1; Silikon tüp, 2; Tepkime ortamı, 3; Enzim, 4; Magnet)

2.8.3.3 Pervaporasyon

Pervaporasyon özellikle atmosferik koşullarda çalışılırsa, uygulaması kolay bir yöntemdir. Fakat sistemde indirgenmiş basınç kullanılacaksa ya da sisteme yoğuşturucu eklenecekse, karmaşık yapıya sahip bir sistem ortaya çıkar.

2.8.3.4 Moleküler elek ekleme

Moleküler eleğin belirli zamanlarda değiştirilmesi gerektiğinden, kullanımı diğer yöntemlere göre daha kısıtlıdır. Özellikle sürekli kontrolde tam anlamı ile bir a_w kontrolü yapmak mümkün değildir. Moleküler eleğin enzimin katalitik aktivitesi üzerine olumsuz etkilerinin bulunabileceğine dair bazı sonuçlar bulunmaktadır (Wehtje *et al.* 1994).

2.8.3.5 Su aktivite kontrolünün pilot ölçek için dezavantajları

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

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

Bunun için enzim, çözücü ve substratlar ayrı ayrı ağız açık kaplara konarak içinde a_w değerleri belli olan doymuş tuz çözeltileri bulunan kapalı kaplar içinde buhar fazdan ön dengeye getirilirler. Bu yöntem ile sadece başlangıç a_w değeri ayarlanır. Bu yöntem başlangıç tepkime hızlarına a_w 'nin etkisinin incelenmesi için uygundur. Tepkime süresince su oluşması ile a_w değeri değişir (Halling,1994).

2.9 Kaynak Araştırması

Yapılan yüksek lisans çalışmasında kaynak araştırması iki ana başlık altında toplanabilir. Bu başlıklardan ilki sekonder alkollerin kinetik rezolüsyonudur. İkinci kısımda ise tuz çiftleri ve doymuş tuz çözeltileri ile a_w kontrolü hakkında incelenen çalışmalar yer almaktadır.

2.9.1 Sekonder alkollerin kinetik rezolüsyonu

Çalışmalarda substrat olarak kullanılan 1-fenil-1-propanol bir sekonder alkoldür. Literatür araştırmasında 1-fenil-1-propanol'ün kinetik rezolüsyonuna ilişkin olarak bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle sekonder alkollerin kinetik rezolüsyonu bir bütün olarak incelenmiştir.

Suan ve Sarmidi'nin 2004 yılında yaptıkları çalışmada rasemik 1-feniletanolün enantiyoseçimli esterleşme tepkimesiyle rezolüsyonunda lipaz kaynağı cinsi, substrat derişimi, çözücü cinsi, sıcaklık ve açıl verici türünün enantiyoseçimlilik ve enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir.

Çalışmalarda altı ticari tutuklanmış enzim kullanılmış ve rezolüsyon için en iyi sonuçlar ChiroCLEC-PC (*P. cepacia*) ve Chirazyme (*C. antarctica*) ile elde edilmiştir. Lipase PS-C (*P. cepacia*) ve Lipase Sol-Gel-Ak (*C. cylindracea*) dışındaki tüm lipazların tepkimeyi katalizleyebildiği görülmüştür. Enantiyomerik aşırılık (ee) değeri Chirazyme (*C. antarctica*) için % 97, ChiroCLEC-PC (*P. cepacia*) için % 96 olarak bulunmuştur.

Laurik asit derişiminin (25-250 mM) etkisi incelendiğinde (R,S)-1-feniletanolün rezolüsyonu için optimum laurik asit derişiminin 150 mM olduğu bu değerin üzerine çıkıldığında substrat inhibisyonu gözlemlendiği belirtilmiştir.

(R,S)-1-feniletanolün rezolüsyonuna çözücü türünün etkisini belirlemek için izooktan (Log P=4,5), heptan (Log P=4), hekzan (Log P=3,5), siklohekzan (Log P=3,2), toluen (Log P=2,5) ve ter-bütilmetileter (Log P=1,4) çözücüleri incelenmiştir. ChiroCLEC-PC (*P. cepacia*) katalizli tepkimelerde çözücü hidrofobikliğinin artmasıyla başlangıç tepkime hızı da artmıştır. Enzim performansı toluen çözücüsünde belirgin şekilde azalmıştır. Ter-bütilmetil eter ise diğer tüm hidrokarbon çözücülerden daha hidrofilik olması nedeniyle düşük tepkime hızı sergilemiştir. Hidrofilik çözücüler enzimin fonksiyonel yapısının parçalaması ya da enzim için gerekli suyu enzimden uzaklaştırması yoluyla enzimi deaktive etmektedir.

Sıcaklık etkisi incelendiğinde, ChiroCLEC-PC aktivitesinin 25 ile 40 °C arasındaki sıcaklıklardan çok fazla etkilenmediği ancak 50 °C'de belirgin şekilde düştüğü görülmüştür. Tepkime hızı optimum sıcaklık olan 35 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda düşmüştür. Bunun nedeni olarak yüksek sıcaklıklarda enzimin deaktive olabileceği belirtilmiştir.

Açıl verici olarak kullanılan yağ asitlerinin zincir uzunluklarının (12 C-18 C) etkisi incelendiğinde ChiroCLEC-PC'nin (*P. cepacia*) kullanıldığı tepkimelerde, başlangıç tepkime hızının laurik asitten (12 C) palmitik asite (16 C) kadar arttığı, ancak stearik asitte % 3-4'lük bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu durum enzimin açıl bağlama bölgesinin karbon sayısının 16 C'a kadar olan açıl grupları için yeterli olabileceği ve stearik asitin uzun açıl zincirine sahip olmasının katalizleme süresince enzimin serbest hareketini engellemiş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Suan and Sarmidi 2004).

Frings ve arkadaşları (1999) *Mucor miehei* (Novozym 388) lipazı katalizörlüğünde rasemik 1-fenil etanolün vinil propiyonat ile organik çözücülü ortamda kinetik rezolüsyonunu incelemiş ve çalışmada çözücünün enzim aktivitesi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Düşük Log P değerlerinde hiç aktivite gözlenmezken enzim aktivitesinin çözücü hidrofobikliği arttıkça tutarlı şekilde arttığı görülmüştür. En iyi sonuçlar hekzan çözücüsünde elde edilmiştir. ter-bütiletileter (MTBE) gibi polar bir çözücüde aktivite gözlenmemesinin nedeni, enzim yüzeyindeki su tabakasının uzaklaşması veya parçalanması yoluyla enzimin inaktive olması şeklinde açıklanmıştır.

2.9.2 Tuz çiftleri ve doymuş tuz çözeltileri ile a_w kontrolü

Su aktivitesi kontrol yöntemleri ile ilgili olarak incelenen literatürden, deneylerde kullanılan iki yöntemle ait olanlar üzerinde durulmuştur. Tuz çiftleri ve doymuş tuz çözeltileri ile a_w kontrolü birçok araştırmacı tarafından başarı ile uygulanmış iki yöntemdir.

Wehtje ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları çalışmada sekonder alkollerin dekanoyik asit ile organik ortamda esterleşme tepkime ile kinetik rezolüsyonunu incelemişlerdir. Yapılan çalışmada farklı lipaz kaynakları kullanılmıştır. Bu lipazlardan en seçimli olanı *Candida antarctica* ($E = 9000$), en az seçimli olanı ise *Candida rugosa* ($E = 1.7$) dır. Çalışmada su aktivitesi kontrolü için doymuş tuz çözeltileri kullanılmış ve su aktivitesinin gaz fazdan dengeye gelmesi için tepkime ortamı ve doymuş tuz çözeltileri kapalı ortamda ve oda sıcaklığında en az 16 saat tutulmuştur. Bu çalışmada araştırmacılar a_w değerleri

0.06-0.97 arasında değişen tuzlar kullanmışlar fakat enantiyoseçimlilik ile su aktivitesi arasında bir ilişki kuramamışlardır. *Candida rugosa* lipazı için enantiyoseçimlilik altı farklı su aktivitesi değerinde belirlenmiş ve tüm tepkimelerde E değeri 1.6- 1.8 arasında elde edilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca farklı substrat derişimlerinde (10–100 mM) çalışılmış ve substrat derişiminin enantiyoseçimlilik ve tepkime başlangıç hızları üzerine etkileri araştırılmıştır. Asit derişimi 100 mM’de sabit tutulmuştur. Alkol derişimi artınca her iki enantiyomerin tepkime başlangıç hızları artış gözlemişler fakat enantiyoseçimlilikte her iki enzim için bir değişikliğin olmadığını görmüşlerdir. Diğer yandan asit derişimi arttırıldında *C. Rugosa* lipazına ait enantiyoseçimlilik değerinde artış olduğunu ($E = 2.2$) bulunmuştur. Bu durumun sebebi olarak asit derişiminin ortamın pH’ını etkilemesi gösterilmiştir. Tepkime hız profili de substrat derişimine bağıllık göstermiş ve substrat inhibisyon profili çizmiştir.

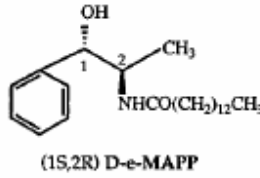
Högberg ve arkadaşları 1993 yılında 2-metil alkanoik asitin *Candida rugosa* ve *Pseudomonas* lipazları katalizli esterleşme tepkimesinde tuz hidrat çiftleri kullanarak sabit bir su aktivitesi değerinde (0.15 ve 0.76) çalışmışlardır. *Pseudomonas* lipazları su aktivitesinden bağımsız görünse de CRL ortama eklenen su miktarına bağılı olarak farklı enantiyoseçimlilik göstermiştir. Su aktivitesinin kontrol edildiği durumda dönüşüm %35’de % 40’a çıkmış ve bu dönüşüme ulaşmak için gerekli tepkime süresi 110 saatte 10 saate düşmüştür. Diğer bir değişle reaksiyon hızı artmıştır.

Literatürde sekonder alkollerin kinetik rezolüsyonunda incelenen parametreler, lipaz kaynağı türü, çözücü türü, açıl verici türü, sıcaklık ve su aktivitesidir. Özellikle su aktivitesi parametresinin incelendiği çalışmalarda substrat derişiminin tepkime başlangıç etkisi üzerine etkisi araştırılmıştır. 1-fenil-1-propanolün kinetik rezolüsyonu üzerine bir çalışmaya rastlanmamış olması nedeni ile ilgili parametreler su aktivitesi kontrolü altında incelenmiştir.

2.10 1-Fenil -1-propanol

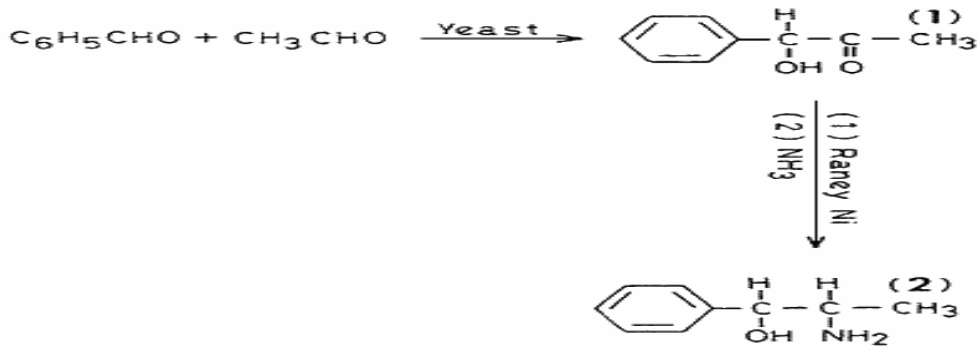
Kiral sekonder alkoller organik kimyada kiral türevlendirme reaktifleri olarak kullanılırlar. Rasemik 1-fenil-1-propanol, zayıf ester kokulu, metanol, etanol, benzen ve toluen ile karışabilen yağimsı sıvı bir maddedir. Endüstride, kozmetik sanayisinde parfümlerin üretilmesinde ve kalıcı olmalarının sağlanmasında, ısı transfer ortamlarında ve genel olarak tıpta Felicur ticari ismiyle safra salgısını arttıran ilaç olarak kullanılır.

Bunların yanısıra kozmetik ve ilaç etken bazı materyaller, 1-fenil-1-propanol grubu ve diğer başka grupların da bağlanmasıyla sentezlenebilmektedir. Örneğin Bielewska ve grubunun yaptığı bir çalışmada, 1-fenil-1-propanol yardımcı grubunu içeren, (1S,2R)-D-eritro-2-(N-Myristoylamino)-1-fenil-1-propanol (D eritro-MAPP) (Şekil 2.24) maddesinin vücuttaki derinin su metabolizmasını ayarlayan ve sıvı tutmasını iyileştiren ve lipid ailesinden olan ceramid maddesinin parçalayan ceramidase enziminin aktivitesini inhibe ettiği anlaşılmıştır (Bielawska *et al.* 1996).



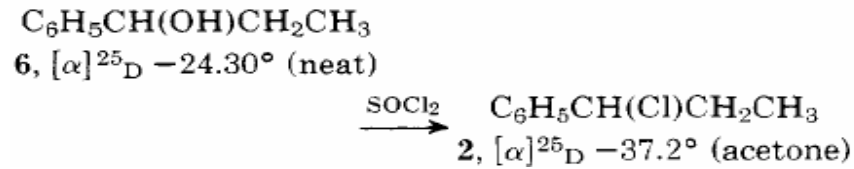
Şekil 2.24 (1S,2R)-D-eritro-2-(N-Myristoylamino)-1-fenil-1-propanol bileşiğinin açık formülü

Ayrıca 1-fenil-1-propanolün amino grubuyla bağlanarak oluşan, (1RS,2SR)-($\pm$)-2-amino-1-fenil-1-propanol bileşiği iyi bir kan basıncını yükseltici ajan olarak kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak bu madde klinik kullanımda nasal dekonjestan olarak kullanılmaktadır. Bu molekül Şekil 2.25’de görülen iki aşamalı tepkime ile oluşmaktadır (Subramanian *et al.* 1987).



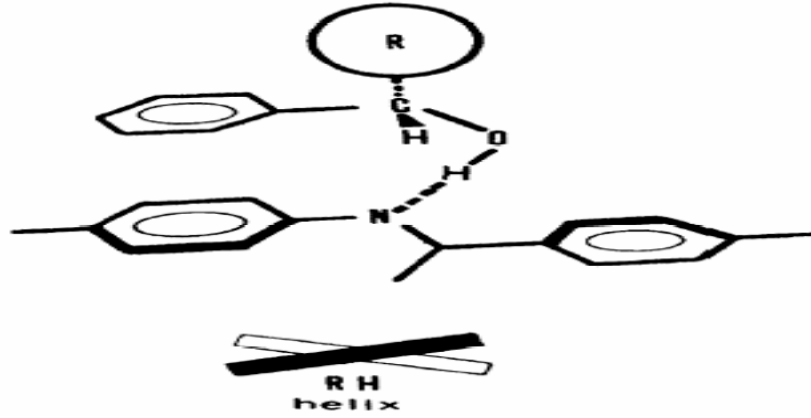
Şekil 2.25 (1R,2S)-(±)-2-amino-1-fenil-1-propanol bileşiğinin iki aşamalı tepkimesi.

1-Fenil-1-propanol'ün R-izomeri optik olarak aktif (R)-1-kloro-1-fenil-1-propan molekülünün sentezi için kullanışlıdır. Stephenson ve çalışma grubu tarafından (R)-1-fenil-1-propanol kullanılarak, tiyonil klorür ile gerçekleştirilen nükleofilik yer değiştirme tepkimesiyle ve ikincil alkoldeki hidroksil grubunun tiyonil klorürdeki klor ile yer değiştirmesiyle, 1-kloro-1-fenil-1-propan molekülü elde edilmiştir (Şekil 2.26). Ayrıca oluşan molekülün optik olarak aktif (R)-1-kloro-1-fenil-1-propan şeklinde bulunduğu saptanmıştır (Stephenson *et al.* 1979).



Şekil 2.26 1-kloro-1-fenil-1-propan molekülünün eldesi.

1-Fenil-1-propanol'ün R-izomerinin kullanıldığı diğer bir alan ise sıvı kristallerin kullanılması üzerine çalışmalardır. Bu konuda Gotarelli ve arkadaşlarının çalışmasında R-izomerin MBBA (N-(p-Methoxybenzylidene)-p-(n-butyl)aniline) nematik çözücüsü içinde çözünmesiyle elde edilen son halinin daha çok R-izomeriyle etkileştiği anlaşılmıştır. Bu etkileşimin sebebi olarak hidrojen bağı etkileşmesi önerilmiştir. Ayrıca S-izomerle güçlü bir etkileşim olamayacağı gösterilmiştir (Şekil 2.27) (Gottarelli *et al.* 1981).



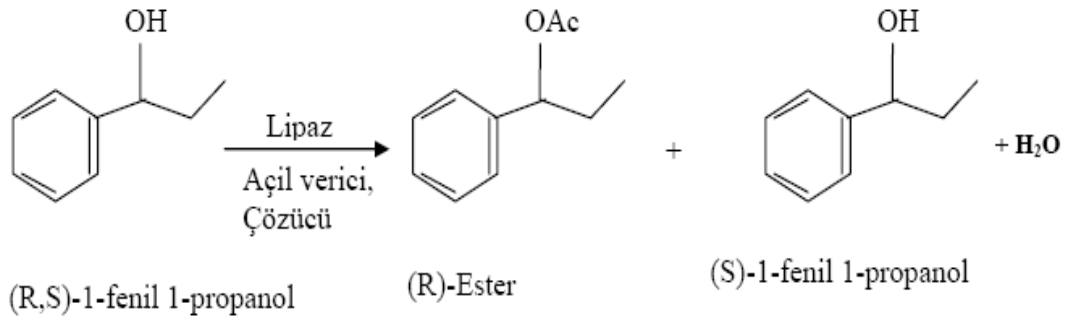
Şekil 2.27 (R) 1-Fenil-1-propanol ile MBBA molekülünün birincil etkileşimi

Enantiyomerik saflıktaki kiral alkoller pek çok farmakolojik ürünün çıkış maddesidir. Sekonder alkol olan 1-fenil 1-propanol türevleri ilaç etken maddesi olarak farmasotik sanayinde geniş kullanım alanlarına sahiptir. (-)-Efedrin HCl ticari adıyla bilinen bir türevi (1R,2S-2-metilamino-1-fenil-1-propanol hidroklorür) bronş açıcı ilaçlar grubuna girmektedir (www.pharma-solutions.basf.com). Bu ilaçlar astım, bronşit ve akciğer ile ilgili hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. (+)-Pseudoefedrin HCl (1S,2S-2-metilamino-1-fenil-1-propanol hidroklorür) ise efedrinin diastereomeridir. Genellikle antihistaminik, parasetamol ve ibuprofen içeren karışımlarda bulunur ve “Sudafed” adıyla ticari olarak satılmaktadır (<http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudoephedrine>). 1-fenil 1-propanolün diğer bir türevi olan PDMP (D-threo 1-Fenil-2-dekanolilamino-3-morfolino-1-propanol) kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Inokucki et al. 1987). Rasemik 1-fenilpropanol ise koleretik (karaciğerin safra üretimini arttıran ajan) bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu kimyasalın (R)-izomeri ise optikçe aktif 1-kloro-1-fenilpropan sentezinde ve terpenlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Uzura *et al.* 2001).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Yüksek lisans çalışmasında (R,S)-1-fenil-1-propanolün lipaz katalizli esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonu (Şekil 3.1) ile R ve S enantiyomerlerin birbirinden en yüksek verimle ayrılması amaçlanmıştır. Bu nedenle ilk olarak enantiyoseçimliliğe etki eden tepkime parametreleri incelenmiştir. İleri çalışmalarda ise en uygun koşullar kullanılarak ortamın su aktivitesi doymuş tuz çözeltileri ve tuz hidrat çiftleri ile kontrol edilmiştir.



Şekil 3.1 (R,S)-1-fenil-1-propanolün lipaz katalizli esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonu

3.1.1 Alkol

Bu araştırmada substrat olarak sekonder alkol olan rasemik (±)-1-fenil-1-propanol kullanılmıştır. (±)-1-Fenil-1-propanol Merck'ten satın alınmış olup, özellikleri Ek 2'de yer almaktadır.

3.1.2 Enzim

Bu yüksek lisans çalışmasında katalizör olarak kullanılan enzimler ticari olarak belirtilen firmalarından temin edilen;

Tutuklu

- Amona Lipase PS-CI (immobilized on seramic) (Aldrich)
- Novozym 435 (Novozym)
- Lipozyme TL IM (Novozym)
- Lipozyme RM IM (Novozym)
- Lipase acrylic resin from *Candida antartica* (Sigma)

ve serbest

- Amona Lipase PS from *Buckholderia cepacia* (Aldrich)
- PS flouresans (Aldrich)
- Lipase from *Mucor meihei* (Aldrich)
- Novozym 735 (*Candida antartica* Lipase A) (Novozym)
- Novozym CALB-L (*Candida antartica* Lipase B) (Novozym)

enzimler kullanılmıştır.

3.1.3 Açıl verici

Esterleşme tepkimelerinin ana girdileri asit ve alkoldür. Çalışmada, bir sekonder alkol olan (R,S)-1-fenil-1-propanol ile tepkime vermek üzere palmitik asit, miristik asit, laurik asit, kaprik asit, hekzanoik asit, stearik asit ve valerik (pentanoik) asit, açıl verici olarak kullanılmış ve Fluka firmasından temin edilmiştir. Açıl vericilere ait fiziksel özellikler Ek 3'te verilmiştir.

3.1.4 Çözücüler

Deneysel çalışmalarda çözücü; katı olan girdileri çözmek ve ortamı homojen hale getirmek için kullanılmaktadır. Farklı log P değerlerine sahip çözücüler siklohekzan, 2,2,4-trimetil pentan (izooktan), oktan ve ter-butil metil eter, Merck firmasından temin edilmiştir. Çözücülere ait bazı özellikler Ek 4'tedir. Ayrıca HPLC analizlerinde kullanılan hekzan ve 2- Propanol, Merck'ten temin edilmiştir.

3.1.5 Tuzlar

Tepkime ortamının su aktivite değerini sabit tutmak için iki ayrı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerin ilkinde tuz çiftleri kullanılmıştır. $\text{Na}_2\text{HPO}_4(7/12)$ ($a_w:0.90$), $\text{Na}_2\text{SO}_4(10/0)$ ($a_w:0.76$) Na_2HPO_4 (2/7) ($a_w:0.69$), $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2(3/0)(0.33)$, $\text{MnCl}_2(2/4)(a_w:0.33)$, $\text{MgCl}_2(6/0)$ ($a_w:0.06$) . Doygun tuz çözeltileri kullanılarak a_w nin kontrol edilmesinde ise $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($a_w:0.98$), $(\text{MgNO}_3).6\text{H}_2\text{O}$ ($a_w:0.54$), CH_3COOK ($a_w:0.23$), LiBr ($a_w:0.15$), $\text{LiCl}(a_w:0.11)$ NaCl ($a_w:0.75$) tuzları kullanılmıştır. Kullanılan tuz çiftleri ve doymuş tuz çözeltilerine ait a_w değerleri sırasıyla, Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de verilmiştir. Çalışmalarda kullanılan tüm tuzlar Merck’ten ticari olarak elde edilmiştir.

Çizelge 3.1 Tuz hidrat çiftlerine ait a_w değerleri

Tuz Çifti	a_w
$\text{MgCl}_2(0/6)$	0.06
$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2(0/3)$	0.33
$\text{MnCl}_2(2/4)$	0.33
$\text{Na}_2\text{HPO}_4(2/7)$	0.69
$\text{Na}_2\text{SO}_4(0/10)$	0.76
$\text{Na}_2\text{HPO}_4(7/12)$	0.90

Çizelge 3.2 Doygun tuz çözeltilerine ait a_w değerleri

Tuz	a_w
LiCl	0.11
LiBr	0.15
CH_3COOK	0.23
$\text{MgNO}_3.6\text{H}_2\text{O}$	0.54
NaCl	0.75
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_3$	0.98

3.1.6 Moleküler elek, TLC kağıdı

Tepkimede, ortamda bulunan suyu uzaklaştırmak amacı ile Sigma'dan temin edilen, sodyum alumina silikat, 4A° boyutundaki moleküler elek kullanılmıştır. Kalitatif analiz, Merck'ten temin edilen 20x20 cm boyutunda silikajel 60 F₂₅₄ TLC kağıdı ile yapılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Rasemik 1-fenil 1-propanolün esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonu

Rasemik 1-fenil 1-propanolün lipaz katalizli esterleşme tepkimesi, 10 mL hacimli ağzı kapaklı viallerde, 3 mL çalışma hacminde, sıcaklık ve karıştırma hızı kontrol edilebilen orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalara ilk olarak uygun lipaz kaynağını belirlenmiştir. Bu amaçla tutuklu ve serbest lipazlar kullanılarak tepkimeler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tepkimenin enantiyomerik oranı (E), enantiyomerik aşırılığı (ee) ve dönüşümü (%) üzerine çözücü cinsi ve açıl verici türü, sıcaklık (0°C-50°C), moleküler elek miktarı (0-500 mg) gibi parametrelerin etkisi belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda en uygun koşullar belirlenmiştir.

(R,S)-1-fenil-1-propanol ve açıl verici tepkime ortamına eklendikten sonra 3 mL çözücü de çözülmüştür. Daha sonra tepkime ortamına 100 mg enzim ve moleküler elek eklenerek tepkime başlatılmıştır. Tepkime saat başı ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanılarak, UV ışığı altında kontrol edilerek takip edilmiştir. % 50 dönüşüm değerine ulaşıldığı düşünüldüğü durumda tepkimeler; tepkime karışımı kaba süzgeç kağıdıyla süzülerek sonlandırılmıştır. Çözücü ortamdan üzerinden hava geçirilerek uzaklaştırılmıştır. Kalan ürünler 2 mL hekzan içinde çözüldükten sonra analize hazır hale getirilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise ortamın su miktarı moleküler elek kullanımı yerine tuz hidrat çiftleri ve doymuş tuz çözeltileri kullanılarak kontrol edilmiştir. Bu deneyler 40 °C ve 150 rpm de Novozym 435 katalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir.

Tepkimenin başlangıç su aktivitesi değerini ayarlamak için tuzların saf su ile hazırlanan çözeltisi ile 24 saat karıştırılarak doymuş çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan doymuş tuz çözeltisi ve kullanılacak olan enzim ve çözücü boş desikatörde ortam sıcaklığında bir hafta boyunca bekletilerek atmosferden a_w 'nin dengeye gelmesi sağlanmıştır. Dengeye belirli bir a_w değerine sahip olan çözücü içine alkol, açıl verici ve enzim hızlı bir şekilde eklenerek tepkime başlatılmıştır. Daha sonra belirli zaman aralıkları ile tepkime kesilerek, örnek, yukarıda belirtildiği gibi HPLC analizi için hazırlanmıştır.

Tuz hidrat çiftleri ile a_w kontrolünde, alkol ve açıl verici tepkime ortamına eklendikten sonra 3 mL çözücü de çözülmüştür. Daha sonra tepkime ortamına su aktivite değeri bilinen tuz hidrat çiftlerini oluşturan her iki tuzdan ortama 0.1 gr direkt olarak eklenmiştir. Daha sonra belirli zaman aralıkları ile tepkime sonlandırılmış ve analizlenmiştir.

3.2.2 HPLC analizleri

Çözücüsü uzaklaştırılan ürün 2 mL hekzan içerisinde çözülerek analiz edilmek üzere hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler, Spectra SYSTEM HPLC cihazında, Chiralcel OB-H (250×4.6 mm) kiral kolonu ile, 0.8 ml/dk akış hızında, taşıyıcı faz olarak n-hekzan/2-propanol: 97/3 kullanılarak, 254 nm dalga boyunda UV dedektör ile analizlenmiştir. Kolon sıcaklığı 30°C olarak, enjeksiyon hacmi ise 5 µl olarak ayarlanmıştır. Elde edilen kromatogramlardan (Ek 5); 2.1 ve 2.2, eşitlikleri yardımıyla ürün ve substrat için enantiyomerik aşırılık, enantiyomerik oran ve dönüşüm değerleri hesaplanmıştır.

3.2.3 Lipaz aktivitesinin belirlenmesi (Ph stat)

Substrat olarak kullanılan 200 µl tribütrin, 10 ml 1 mM Tris-HCl tamponu (pH=7.2) içerisinde çözüldükten sonra 0.5 mg enzim tampon içerisine eklenmiştir. Tepkime 40 °C'de 150 rpm hızındaki orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. 10 dakika sonunda enzim, tampon ortamından filtre kağıdı ile ayrılmış ve tepkime sonlandırılmıştır. Tampon içerisine birkaç damla fenolftalein eklendikten sonra 0.1 M NaOH çözeltisiyle titrasyon gerçekleştirilmiştir. Bir ünite, µmol substratı bir dakikada dönüştüren enzim miktarıdır. (Kim *et al.* 2000). Ek 6 'da örnek hesaplama verilmiştir.

3.2.4 Su aktivitesi ölçümü

Su aktivitesi kontrol deneylerinde, tepkime ortamının a_w değerini belirlemek amacı ile Novasina a_w sprit su aktivitesi ölçüm cihazı kullanılmıştır.

3.2.5 Başlangıç tepkime hızının belirlenmesi

Substrat derişiminin tepkime başlangıç hızına (r_0) etkisinin incelenmesi amacı ile tuz hidrat çiftleri ile su aktivitesi kontrolü deneylerinde zamanla alınan örneklerden elde edilen dönüşüm değerleri kullanılarak t- C_A grafikleri çizilmiş ve tepkime hızı;

$$-r_A = dC_A / dt \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

denkleminde hesaplanmıştır. Hesaplamalar için kullanılan t- C_A grafikleri Ek-7'de gösterilmiştir. Ayrıca örnek hesaplama Ek 8' de verilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında rasemik 1-fenil-1-propanolün esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu çeşitli lipaz enzimleri biyokatalizörlüğünde gerçekleştirilmiş ve enantiyomerik saflıkta 1-fenil 1-propanol'ün elde edilmesinde enzim türü, açıl verici ve çözücü türü, moleküler elek miktarı, sıcaklık ve tutuklama parametrelerin etkisi araştırılmıştır. Daha sonra tepkime ortamının su aktivitesini kontrol etmek amacı ile doygun tuz çözeltileri ve tuz çiftleri kullanılarak rasemik 1-fenil-1-propanolün kinetik rezolüsyonu gerçekleştirilmiştir. Doygun tuz çözeltileri ile yapılan su aktivitesi kontrolü deneylerinde enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Tuz hidrat çiftleri ile su aktivitesi kontrol deneylerinde ise enzim aktivitesinin yanı sıra farklı substrat derişimlerinde tepkime başlangıç hızları incelenmiştir.

4.1 (R,S)-1-Fenil-1-propanolün Lipaz Katalizörlüğünde Kinetik Rezolüsyonu

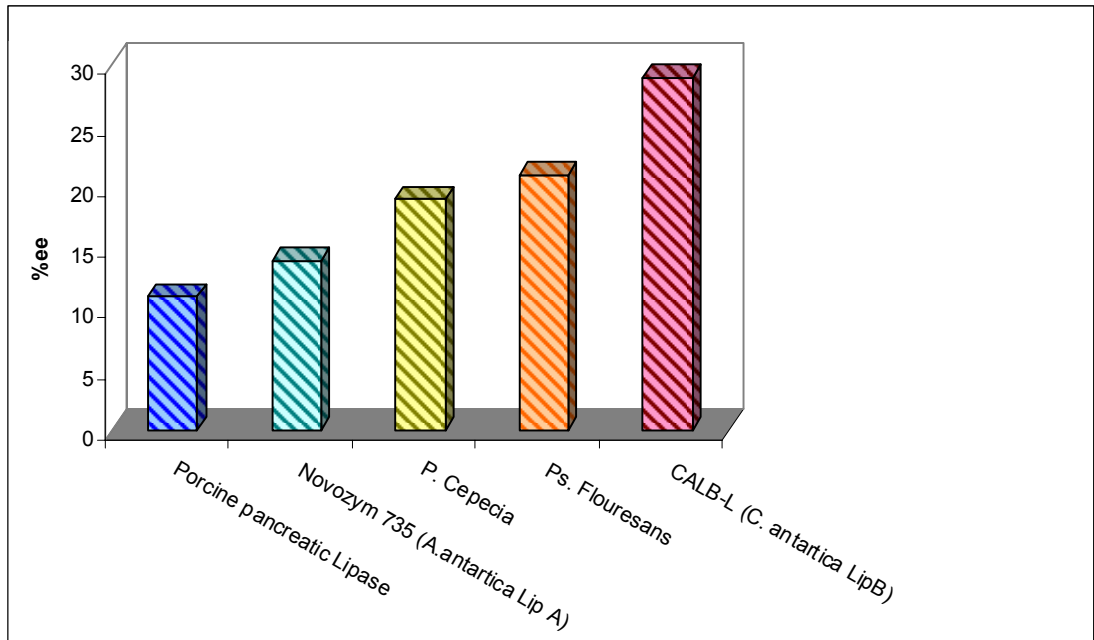
4.1.1 Lipaz kaynağı etkisi

Rasemik 1-fenil-1-propanolün enantiyoseçimli esterleşme tepkimesinde lipaz kaynağının etkisini incelemek amacıyla farklı kaynaklardan elde edilen enzimler kullanılmıştır. Açıl verici olarak kullanılan 1 mmol laurik asit, 3 ml izooktan içinde çözüldükten sonra tepkime ortamına 0,5 mmol (R,S)-1-fenil-1-propanol ve 100 mg moleküler elek eklenmiştir. En son enzim eklenerek tepkime başlatılmıştır. Tepkimeler 30 °C'de ve 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. Esterleşme tepkimesi sonunda (R)-1-fenil-1-propanol azalırken, (S)-1-fenil-1-propanol büyük ölçüde değişmeden kalmıştır.

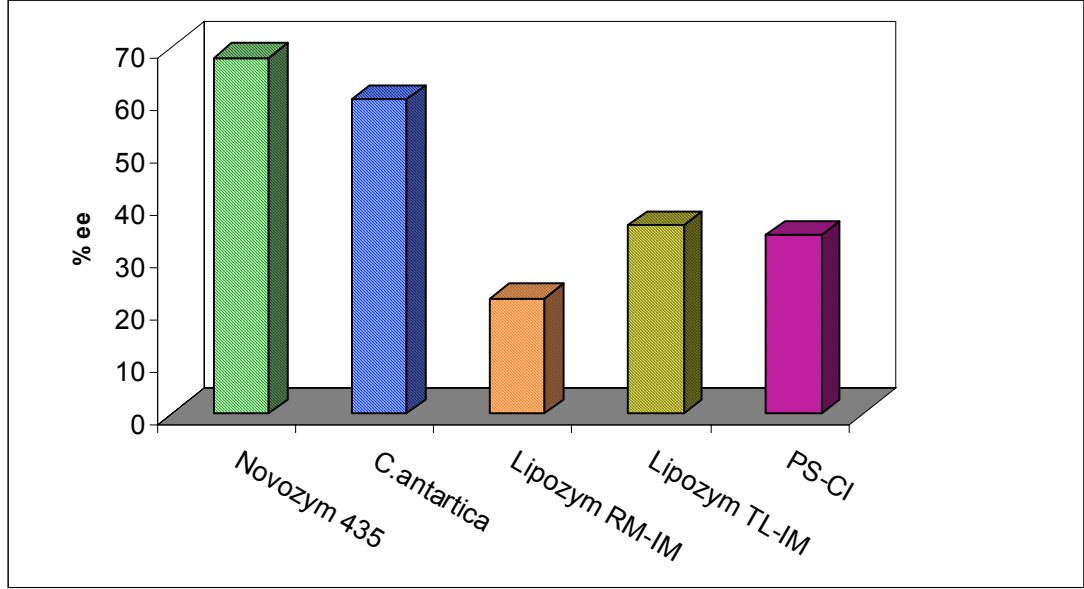
Çalışılan enzimler içerisinde en yüksek enantiyomerik aşırılık değerleri (%ee) Serbest enzimlerde CALB-L (*C.antartica* Lipaz B) ile %29 (Şekil 4.1) ve tutuklu *Candida antartica* kaynaklı lipaz olan Novozym 435 enzimi ile %68 (Şekil 4.2) olarak elde edilmiştir. Ek 8'de verilen sonuçlar incelendiğinde tutuklu enzimlerle çok daha kısa sürede yüksek dönüşüm değerlerine ulaşıldığı görülmektedir.

Görüldüğü gibi tutuklanmış bir enzim olan Novozym 435 ile daha yüksek ee değeri elde edilmiştir. Benzer şekilde, Panzavolda *et al.* (2004) tarafından tutuklanmış enzimlerin, sıcaklık ve pH değişimlerinde daha yüksek kararlılık gösterdiği ve ayrıca yüksek başlangıç hızı ve enantiyoseçimlilik gözlemlendiği belirtilmiştir.

Bölüm 2.5’de de belirtildiği gibi lipazlar iki farklı yapısal (konformasyonel) formda bulunabilir. Bunlardan biri lipazın aktif merkezinin tepkime ortamından ‘kapak’ adı verilen polipeptid zincirle kapatılması sonucu oluşan ‘kapalı (inaktif) form’ ve kapağın açılması ile aktif merkez ve tepkime ortamının etkileşebildiği ‘açık (aktif) form’dur. Tutuklama işlemi ile enzimin konformasyonunda enantiyoseçimliliği arttıracak olumlu değişimlerin meydana geldiği düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Daha yüksek enantiyoseçimlilik değerinin gözlenmesinin yanı sıra tepkime süresinin çok daha kısa olması nedeni ile çalışmalar tutuklu enzimler üzerine yoğunlaştırılmıştır.



Şekil 4.1 Serbest enzimlerin enantiyomerik aşırılığa etkisi (30°C, 150 rpm, Açıl verici; Laurik asit, Çözücü; TMP)



Şekil 4.2 Tutuklu enzimlerin enantiyomerik aşırılığa etkisi (30°C, 150 rpm Açıl verici; Laurik asit, Çözücü; TMP)

Yine literatürde sekonder alkollerin esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonunda *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa* kaynaklı lipazların uygun olduğu belirtilmiştir (Berlund, 2001). Ghanem ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada ise bir sekonder alkol olan 1-fenil etanol'ün lipaz katalizli esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonuna lipaz kaynağı, açıl verici türü, çözücü türü ve sıcaklık etkileri dolgulu yatak reaktörde incelenmiştir. Kullanılan altı tutuklu lipazdan *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica* kaynaklı lipazlarla olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

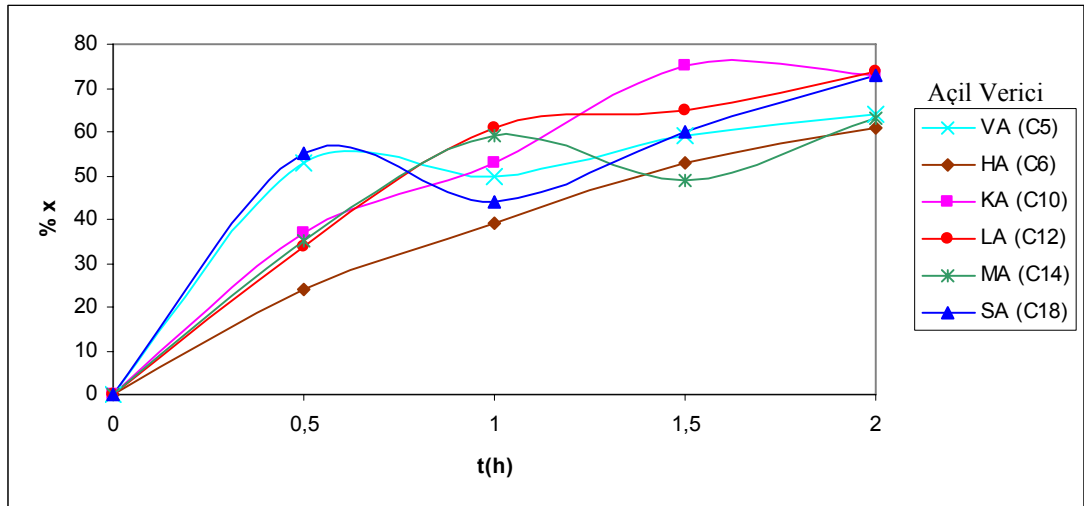
Enzimlerle yapılan çalışmalar sonucunda *Candida antarctica* kaynaklı tutuklu bir ticari lipaz olan Novozym 435 enziminin (R,S)-1-fenil 1-propanolün yüksek enantiyomerik saflıkta elde edilmesinde kullanılabileceğini göstermiştir. Bu nedenle deneylere Novozym 435 ile devam edilmiştir.

4.1.2 Acil verici ve çözücü türü etkisi

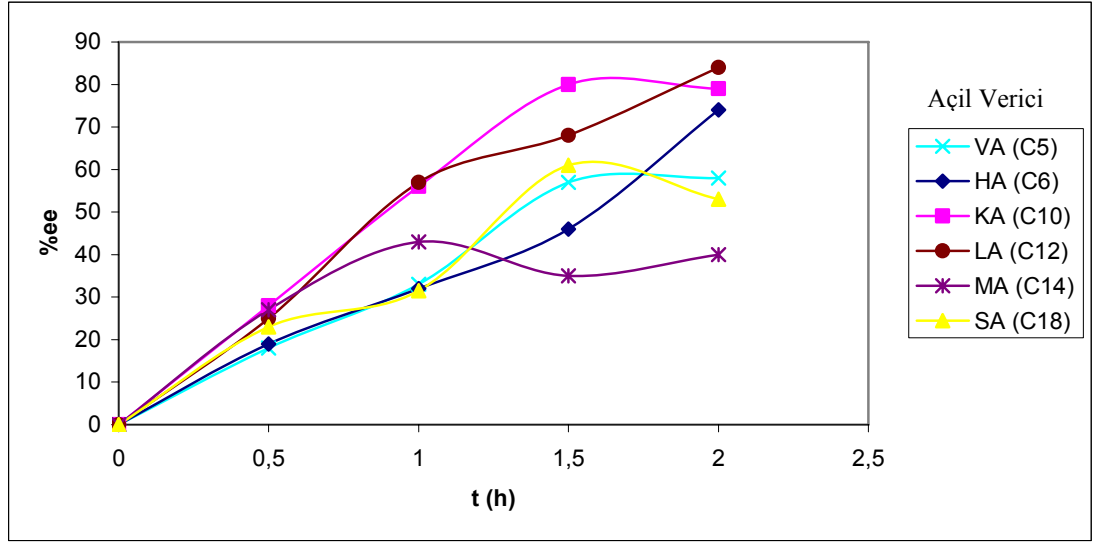
Novozym 435 enzimi katalizörlüğünde rasemik 1-fenil-1-propanolün esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonuna açıl verici türünün etkisi araştırılırken kullanılan farklı zincir uzunluklarına sahip olan açıl vericilere ait bazı özellikler Ek 3'te verilmiştir.

Esterleşme tepkimelerinde asit ve alkol ana girdi bileşenleridir. Kinetik rezolüsyon tepkimelerinde esterleşme tepkimelerinin kullanılması, açıl verici olarak kullanılan asitlerin kimyasal olarak daha kararlı, daha az toksik, daha ucuz ve piyasada kolay bulunabilir olmasından dolayı avantajlıdır.

Deneylerde 1 mmol açıl verici, 3 mL izooktan içinde çözüldükten sonra tepkime ortamına sırasıyla 0,5 mmol (R,S)-1-fenil 1-propanol, 100 mg moleküler elek ve 100 mg enzim eklenmiştir. Tepkimeler 30 °C'de ve 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir. Zamanla alınan örneklerin analizlenmesi ile elde edilen dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te görülmektedir.



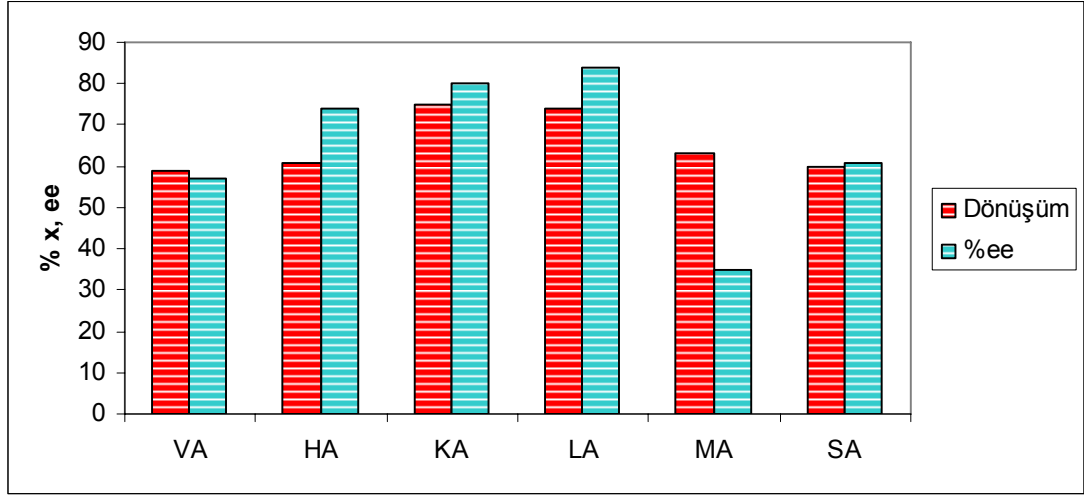
Şekil 4.3 Açıl vericilerin ve tepkime süresinin dönüşüme etkisi (30°C, 150 rpm Enzim; Novozym 435, Çözücü;TMP)



Şekil 4.4 Açıl vericilerin ve tepkime süresinin enantiyomerik aşırılığa etkisi (30°C, 150 rpm Enzim; Novozym 435, Çözücü; TMP)

Uzun zincirli yapıya sahip miristik asit (MA) ve stearik asit (SA) ile yapılan deneylerde diğer asitlere oranla daha düşük % ee değerleri elde edilmiştir. Kaprik asit (KA)'le %73 dönüşümde %80 ee değeri ve Laurik asit(LA)'le % 74 dönüşümde %84 ee değeri ile en iyi sonuçlara ulaşılmıştır (Şekil 4.5).

Ghanem ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada ise 1-fenil etanolün kinetik rezolüsyonunda karbon sayısı 12-18 arası olan açıl vericiler denenmiş ve aralarından en iyi sonucun laurik asit ile elde edildiği belirtilmiştir.



Şekil 4.5 Açıl vericilerin dönüşüme ve enantiyomerik aşırılığa etkisi (Enzim: Novozym 435, T: 30°C, N: 150 rpm, Çözücü : TMP)

4.1.3 Çözücü türü etkisi

Kinetik rezolüsyon çalışmalarında çözücü türünün etkisini belirlemek amacı ile yapılan deneylerde ter butil metil eter (TBME) ($\log P = 1.66$), sikloheksan ($\log P = 3.26$), izooktan (TMP) ($\log P = 4.5$) ve oktan ($\log P = 5.18$) kullanılmıştır.

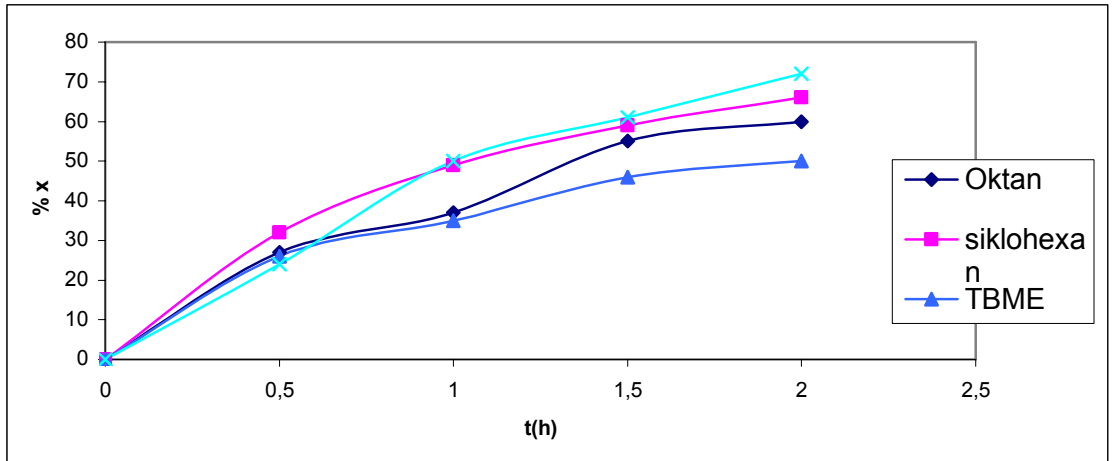
Açıl verici denemelerinde izooktan ile iyi sonuç veren laurik asit (LA) ve kaprik asit (KA), her çözücü ile denenmiştir. 0,5 mmol (R,S)-1-fenil-1-propanol ve sırasıyla 1 mmol açıl verici, 3 ml çözücüde çözündükten sonra 300 mg moleküler elek ve 100 mg Novozym 435 enzimi eklenerek tepkimeler başlatılmıştır.

Laurik asit ve kaprik asit için dönüşüm-zaman grafikleri sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’da; dönüşüm-ee grafikleri ise sırasıyla Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’de gösterilmiştir. Farklı çözücülerde gerçekleştirilen Laurik asit ve kaprik asitin açıl verici olarak kullanıldığı tepkimelere ait ee ve dönüşüm değerleri açısından bakıldığında Log P değeri 4’e yakın olan, sikloheksan ($\log P = 3.26$) ve izooktan ($\log P = 4.5$)’ın diğerlerine göre iyi sonuç verdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.10). Bu açıl vericiler arasından kaprik asitin, Log P değeri

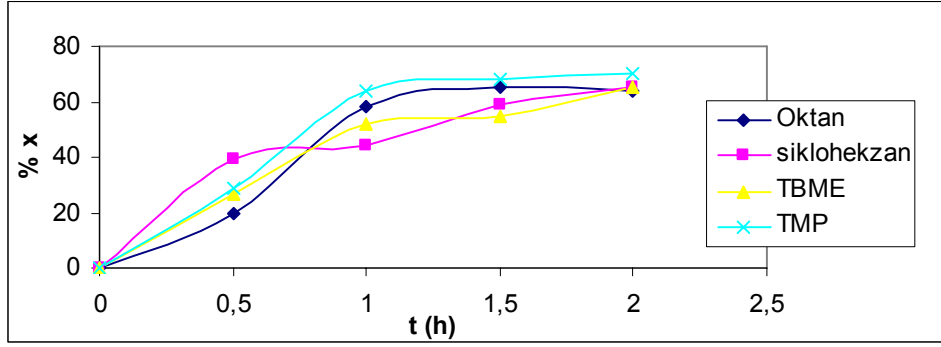
4.5 olan izooktan ile % 70 dönüşüm oranında % 92 ee değeri ile en iyi sonucu verdiği bulunmuştur.

Çözücü hidrofobikliği Log P değeri ile karakterize edilmektedir. Log P değeri oktanol-su çift fazlı sisteminde çözücünün dağılma katsayısının logaritmasıdır. Hidrofilik çözücüler enzim için gerekli suyu uzaklaştırmak ya da enzimin fonksiyonel yapısını parçalamak suretiyle enzimi deaktive edebilirler. Bunun nedeni suyun enzime bağlanmaktansa hidrofilik çözücülere ilgisinin daha fazla olmasıdır (Suan and Sarmidi 2004). Genellikle lipazların aktiviteleri hidrofobik çözücülerde daha yüksek olmasına rağmen bazı hidrofobik çözücüler enzim aktivitesi için gerekli olan enzim yüzeyindeki suyu çekmelerinden dolayı inhibisyon etkisinde yaratabilirler (Frings *et al.* 1999). Log P değeri 2-4 arasında değişen organik çözücüler enzim yapısında zayıf bozulmalara neden olabilir ve bu tür çözücülerde enzim aktivitesini önceden tahmin etmek mümkün değildir (Krishna and Karanth 2002).

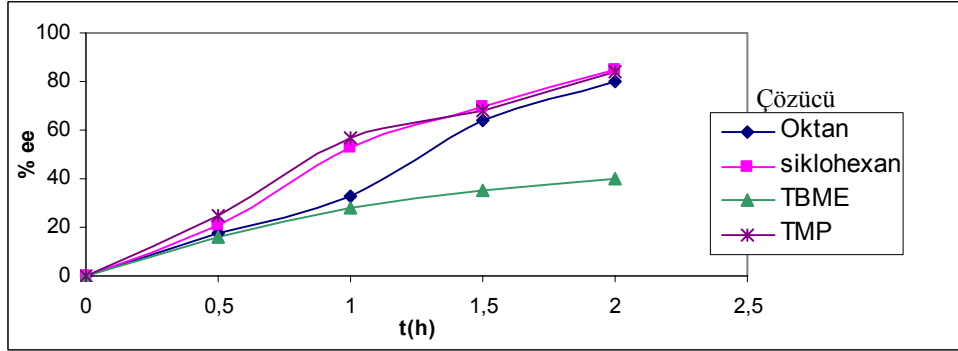
Furukawa ve arkadaşlarının (2001), *Mucor miehei* lipazı ile 1-fenil etanol ile vinil propiyonatın organik ortamda kinetik rezolüsyonunun incelendiği çalışmada düşük log P değerlerinde hiç aktivite gözlenmezken, aktivitenin çözücü hidrofobikliği artması ile arttığı belirtilmiştir. Log P 3.5 değerindeki hekzan optimum sonuç vermiştir. Log P değeri ile enantoseçimlilik arasında düzenli bir ilişki bulunamamıştır.



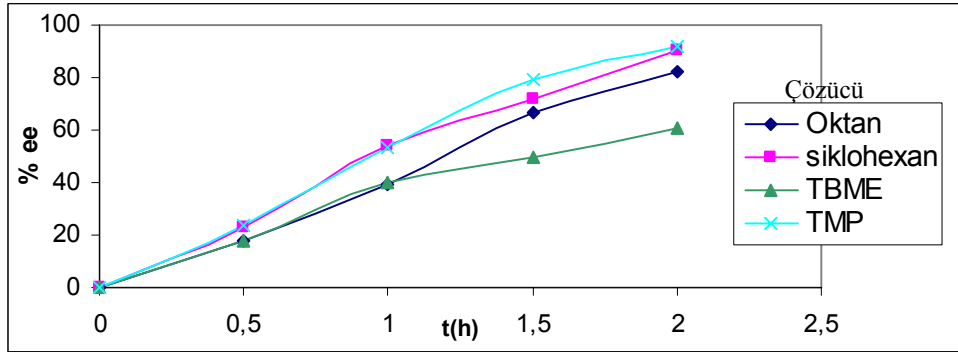
Şekil 4.6 Laurik asitin açıl verici olarak kullanıldığı çözücü deneylerinde tepkime süresi ile dönüşümün değişimi (Enzim: Novozym 435, T: 30°C, N: 150 rpm)



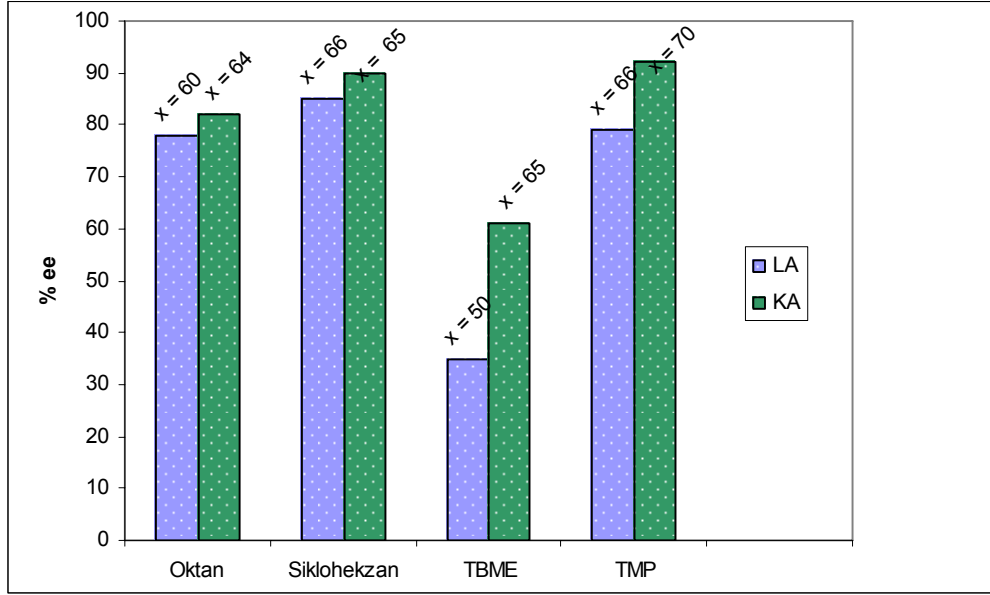
Şekil 4.7 Kaprik asitin açıl verici olarak kullanıldığı çözücü deneylerinde tepkime süresi ile dönüşümün değişimi (Enzim:Novozym 435, T: 30°C, N: 150rpm)



Şekil 4.8 Laurik asitin açıl verici olarak kullanıldığı çözücü deneylerinde tepkime süresi ile enantiyomerik aşırılığın değişimi (Enzim:Novozym 435, T: 30 °C, N: 150 rpm)



Şekil 4.9 Kaprik asitin açıl verici olarak kullanıldığı çözücü deneylerinde tepkime süresi ile enantiyomerik aşırılığın değişimi (Enzim:Novozym 435, T: 30 °C, N: 150rpm)



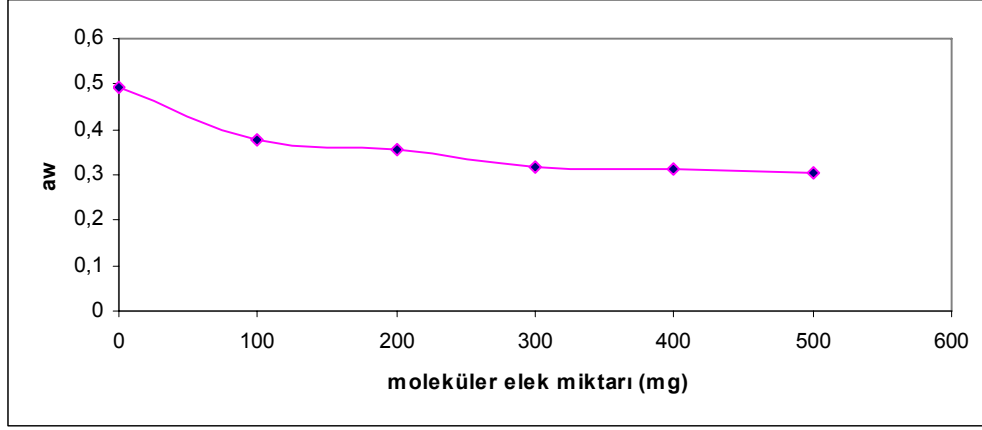
Şekil 4.10 Farklı çözücülerde gerçekleştirilen laurik asit ve kaprik asitin açıl verici olarak kullanıldığı tepkimelerde çözücü türünün enantiyomerik aşırılığa ve dönüşüme etkisi (Enzim: Novozym 435, T: 30 °C, N: 150 rpm)

Bu çalışmada ise düşük log P değerine sahip olan TBME (1.66) ile en düşük ee değeri elde edilirken log P değeri 3.25 den daha yüksek olan çözücülerle ise daha yüksek ee değerleri elde edilmiştir. Log P 3.25’den daha fazla arttırıldığında ee değerinde çok fazla bir değişim olmamıştır. Çalışmalara izooktan (TMP) ile devam edilmiştir.

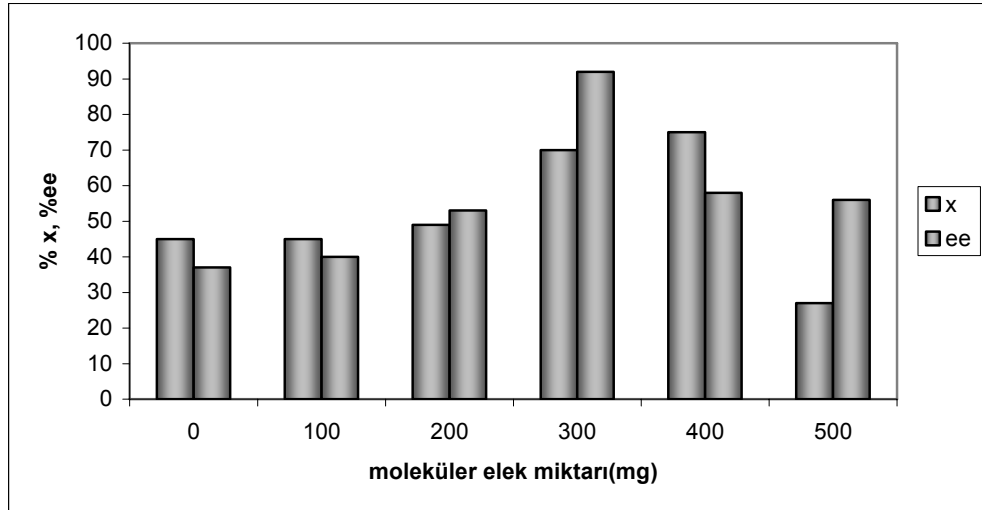
4.1.4 Moleküler elek miktarı etkisi

Moleküler elek miktarı etkisinin incelenmesi amacıyla tepkime ortamına 0, 100, 200, 300, 400 ve 500 mg moleküler elek eklenmiştir. Açıl verici olarak kaprik asit, organik çözücü olarak izooktan kullanılmıştır. Açıl verici/alkol mol oranı olarak 2/1 oranı esas alınmış ve tepkime ortamına 1 mmol açıl verici ile 0,5 mmol (R,S)-1-fenil 1-propanol eklenmiştir. 100 mg Novozym 435 eklenerek tepkime başlatılmıştır. Ayrıca yukarıda belirtilen miktarlarda moleküler eleklerle muamele edilen çözücülerin a_w değerleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.11’de verilmiştir. Buradan da görüldüğü gibi moleküler elek miktarı arttırılması ile a_w değeri hızlı bir düşüş göstermiş fakat 300mg’dan sonra a_w değerinde fazla bir değişim

gözlenmemiştir. Moleküler elek miktarının %ee ve %x üzerine etkisi Şekil 4.12’de görülmektedir.



Şekil 4.11 Moleküler elek miktarı ile a_w ’nin değişimi (T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP)



Şekil 4.12 Moleküler elek miktarının enantiyomerik aşırılığa ve dönüşüme etkisi (T:40 °C, N; 150 rpm, Çözücü: TMP)

Moleküler eleğin tepkime ortamına eklenme nedeni bir denge tepkimesi olan esterleşme tepkimesi sonucu oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Suyun ortamdan uzaklaştırılmasıyla tepkime, ürünler yönüne doğru kayar. Moleküler eleğin ortamdaki suyu uzaklaştırmanın yanında enzim davranışını etkilediğine dair çalışmalar literatürde mevcuttur (Fontes *et al.* 2002). Moleküler elek miktarı arttıkça ortamda bulunan su miktarı azalacağından dolayı esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonda dönüşümün daha hızlı

artması beklenir. Yapılan deneylerde 300mg a kadar bu durum gözlenmiştir. 300mg da okunan a_w değeri 0.33 dür (Şekil 4.15'den de görüldüğü gibi, moleküler elek miktarının 300 mg olduğu durumda ee değeri % 92 ile en yüksek değerine ulaşmıştır). Moleküler elek miktarının daha da arttırılması ile su aktivitesi çok fazla değişmemesine rağmen ee'nin düşüş göstermesinin nedeni olarak 3 mL tepkime hacmine çok fazla miktarda moleküler elek bulunduğu ve ortam viskozitesinin arttığı için kütle aktarım kısıtlamalarının tepkimeyi yavaşlattığı düşünülmektedir.

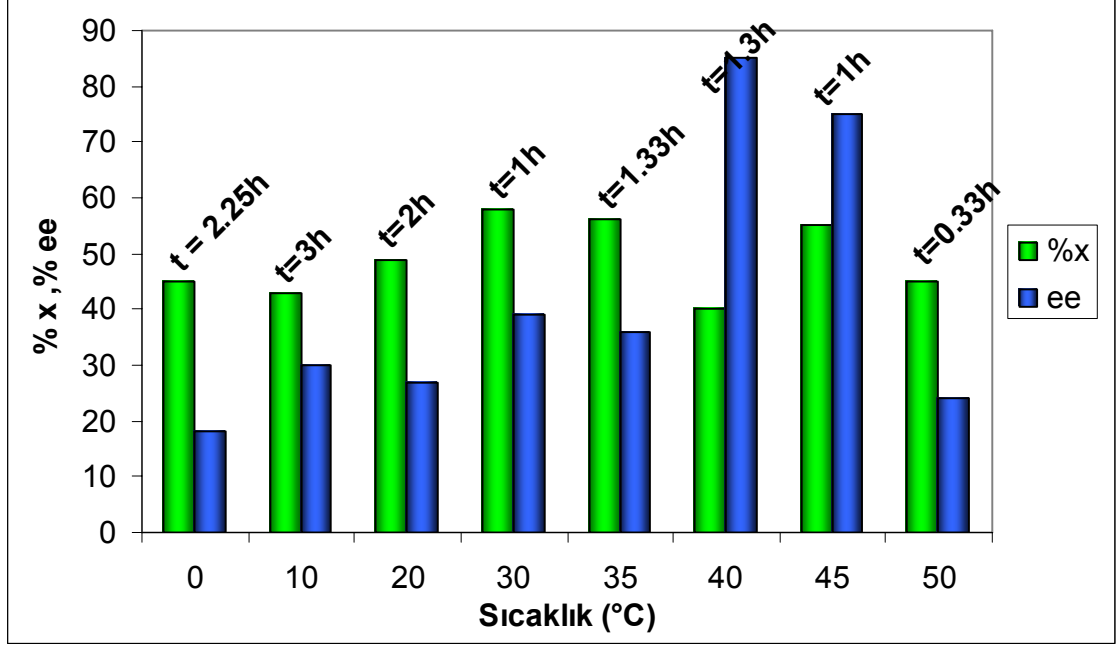
4.1.5 Sıcaklık etkisi

Rasemik 1-fenil-1-propanolün enantiyoseçimli esterleşme tepkimesine sıcaklık etkisinin incelemesi amacıyla tepkimeler, 0-50 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık etkisinin incelendiği çalışmada çözücü olarak izooktan (3 ml), açıl verici olarak laurik asit (1 mmol) ve 0,5 mmol (R,S)-1-fenil-1-propanol kullanılmıştır. Daha sonra tepkime ortamına 300 mg moleküler elek ve 100 mg Novozym 435 enzimi eklenmiştir. Tepkimeler 150 rpm karıştırma hızındaki orbital çalkalayıcılarda gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Şekil 4.13'da verilmiştir.

Enzimlerin enantiyoseçimlilikleri sıcaklığa karşı oldukça duyarlı olsa da, maksimum aktivitelerini ılımlı koşullarda gösterdikleri bilinmektedir. Bu sıcaklık genellikle 37°C civarındır. Sıcaklık değeri 30°C'nin altına düştüğünde tepkime vermeleri zorlaşmaktadır.

Tepkime sıcaklığı enzimatik tepkimeler üzerinde büyük etkiye sahiptir. Yapılan deneylerde Ayrıca sıcaklık artışı tepkime hızını etkilemiş ve tepkime süresinde azalmaya neden olmuştur. Yüksek sıcaklıklarda enzimler katalitik aktivitelerini kaybedebilmektedir. Bu da enzimin üç boyutlu yapısının yüksek sıcaklıklarda bozulmasıyla ilgilidir. Yapılan deneyler Novozym 435 enziminin 0 °C ile 50 °C arasındaki sıcaklıklarda enantiyoseçimli esterleşme tepkimesini katalizlediğini göstermiştir.

En uygun sıcaklık 40 °C olarak bulunmuştur. Sıcaklığın artması veya azalmasıyla enantiyoseçimlilikte düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.13). 40 °C’de çözücü olarak izooktan açıl verici olarak ise laurik asit kullanıldığında %40 dönüşümde, %85 ee değerine ulaşılmıştır.



Şekil 4.13 Sıcaklığın enantiyomerik aşırılığa ve dönüşüme etkisi (Enzim: Novozym 435, N: 150rpm, Çözücü: TMP, Moleküler elek miktarı: 300 mg)

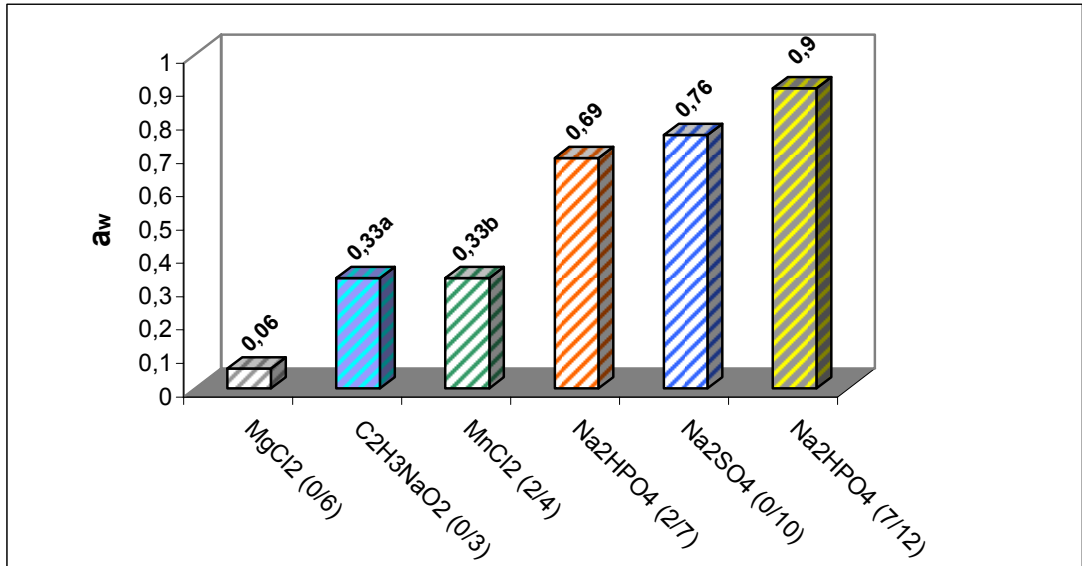
4.2 Su aktivitesi kontrolünün tuz hidratlarla yapıldığı çalışmalar

Deneysel çalışmaların ilk aşamasında elde edilen optimum koşullar; enzim olarak Novozym 435, çözücü olarak izooktan, açıl verici olarak kaprik asit ve sıcaklık 40°C belirlenmiş ve çalışmaların ikinci kısmına bu koşullarda çalışılmaya devam edilmiştir.

Biyokatalitik esterleşme tepkimelerinde, tepkime boyunca su oluşmaktadır. Bu proses boyunca su miktarının sürekli değişeceği anlamına gelmektedir. Optimum koşullarda gerçekleşen tepkimenin hızı, belli bir süreden sonra ortamda oluşan su miktarının fazlalığı nedeni ile tekrar düşecek ve ters tepkime hidroliz hızı artacaktır.

Esterleşme tepkimelerinde su miktarının kontrol edilmesinde basit ve etkili bir yol, uygun tuz hidrat çiftinin tepkime ortamına eklenmesidir (Kvittingen *et al.* 1992).

Tez çalışmasının ikinci aşamasında tepkime ortamının su aktivitesi tuz hidrat çiftleri ile kontrol edilmiştir. Tuz hidrat çiftleri tepkime ortamına direkt olarak eklenmekte ve sürekli bir a_w kontrolü sağlamaktadır. Bu yöntemle ortamın su aktivitesi tepkime boyunca kontrol edilebilmektedir. Su aktivitesinin yanı sıra tuz cinsinin de etkisinin incelenmesi için aynı su aktivitesi değerine sahip farklı iki tuz kullanılmıştır. Başlangıçta ortama eklenecek tuz miktarının belirlenmesi amacı ile 168 mM substrat derişiminde farklı tuz miktarları ile deneyler yapılmıştır. Tuz çiftleri ile 50, 168, 250 ve 330 mM substrat derişimlerinde çalışılmış ve elde edilen dönüşüm değerleri yardımı ile başlangıç hızları hesaplanarak, substrat derişiminin başlangıç hızına etkisi incelenmiştir. Şekil 4.14’de deneylerde kullanılan tuzlar ve tuz çiftlerine ait a_w değerleri verilmiştir.



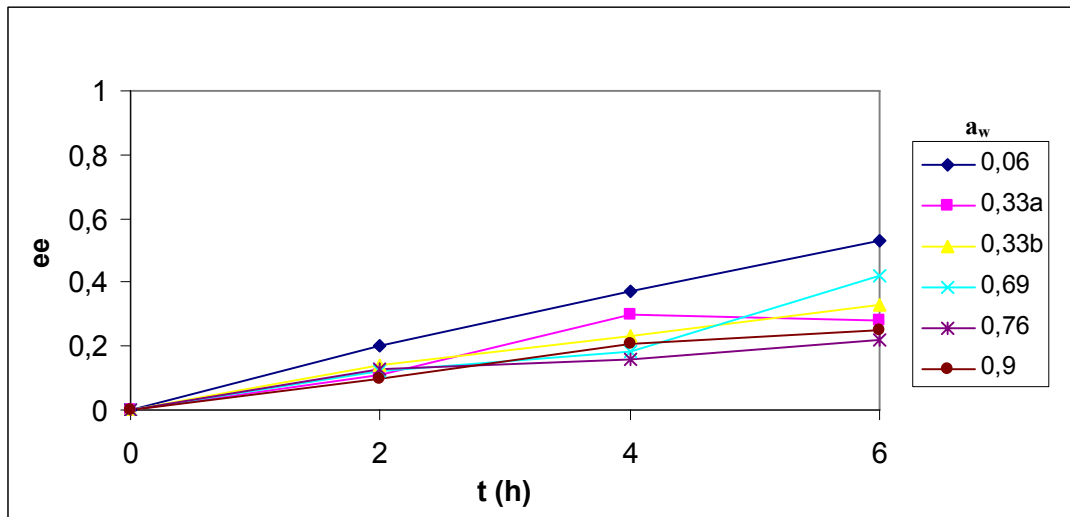
Şekil 4.14 Tuz çiftlerinin a_w değerleri

Organik ortamda gerçekleşen bazı enzim katalizörlü tepkimelerin hızları, tepkime ortamının su içeriğinden etkilenmektedir. İyi bir üretkenlik için sabit bir su aktivitesi

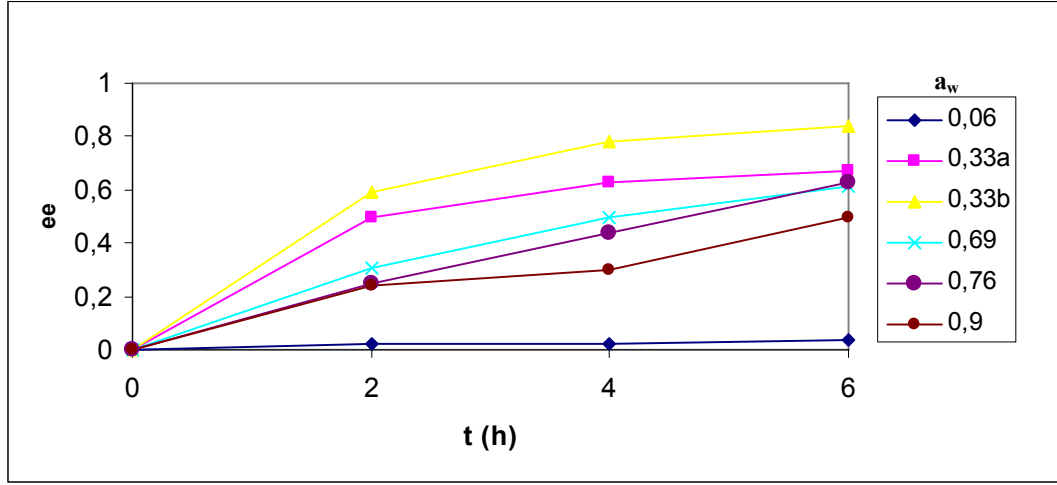
istenir. Sabit su aktivitesi elde etmek için ise en kolay yol ise organik ortamda esterleşme tepkimesini ikili tuz karışımı örneğin anhidrat tuz ve eş hidrat tuzu varlığında gerçekleştirmektir (Högberg *et al.*1993).

4.2.1 Tuz miktarı

Ortama elenecek tuz miktarının etkisinin araştırılması için 168 mM substrat derişiminde ilk olarak tuz çiftlerinden her birinden ortama 0.05 gr eklenmiş ve enantiyomerik aşırılığın a_w ve zamanla değişimi Şekil 4.15'te verilmiştir. Daha sonra bu miktar 0.1 gr'a çıkartılmıştır. Yapılan deneyler sonucu elde edilen veriler Şekil 4.16'da karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.15 168 mM Substrat derişiminde zaman-ee (0.05 g tuz ,T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP)



Şekil 4.16 168 mM Substrat derişiminde zaman-ee (0.1 g tuz ,T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP)

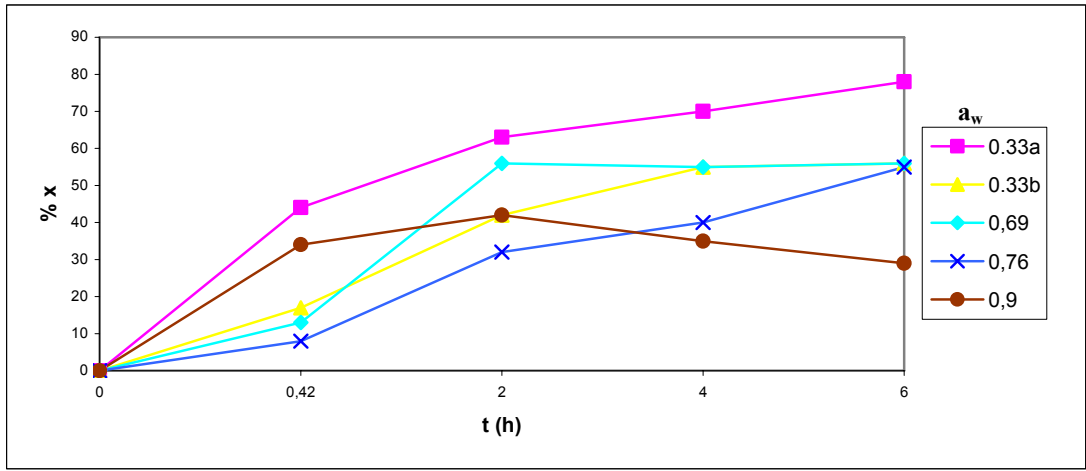
Düşük miktarda tuz kullanıldığında $a_w = 0.06$ da en yüksek %ee değeri elde edilirken daha yüksek tuz miktarı kullanıldığında en düşük ee değeri elde edilmektedir aynı zamanda 0.33 a_w değerinde düşük tuz miktarı ile düşük ee değerine karşılık yüksek tuz miktarı kullanıldığında en yüksek enantiyomerik aşırılık değerine ulaşılmaktadır.

Uygun su aktivitesinin başarı ile elde edilebilmesi için yeterli miktarda tuz çiftinin ortamda bulunması gerekmektedir. Genellikle gerekli miktarın biraz fazlası ortamda bulunabilir. Kvittingen ve arkadaşları 1992’de farklı tuz miktarlarında çalışarak, ortama eklenen tuz miktarının tepkimeye etkisini araştırmışlar ve uygun bir seviyede kullanılan tuz çiftlerinin dönüşümün çok fazla etkilemediğini, fakat düşük seviyede tuz çifti kullanıldığında etkili bir a_w kontrolü yapılamadığını belirtmişlerdir. Literatürde a_w ’nin enantiyoseçimlilik üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda tuz miktarının ee üzerine etkisini inceleyen bir yayın bulunmamaktadır.

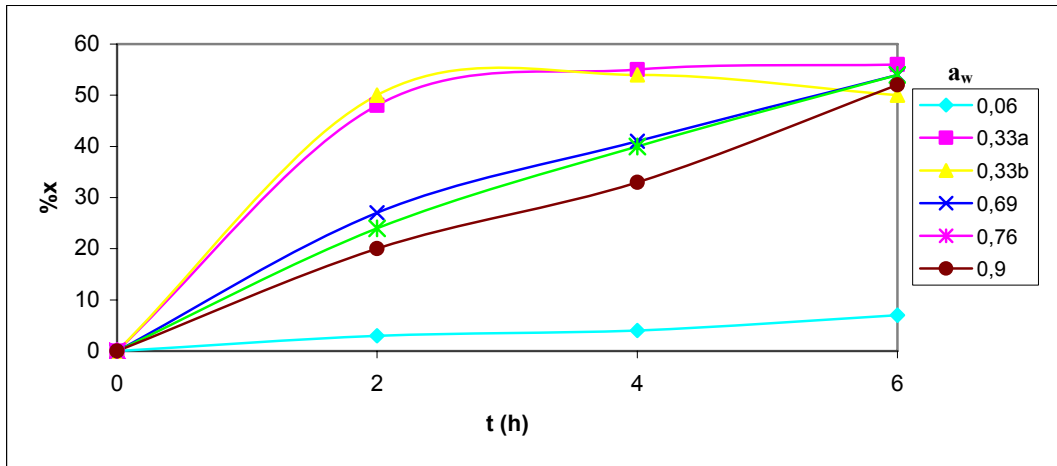
Moleküler elek ile su aktivitesi kontrolünde $a_w = 0.33$ değerinde en yüksek ee’ye ulaşılmıştı. Benzer şekilde burada da her iki tuz miktarında $a_w = 0.33$ için sonuçların aynı doğrultuda olması beklenmektedir. Düşük miktarda tuz çiftinin ortamın su aktivitesini kontrol etmekte yetersiz olduğu görülmüştür. Bu nedenle deneylere 0.1 gr tuz kullanılarak devam edilmiştir.

4.2.2 Substrat derişiminin tepkime başlangıç hızına etkisi

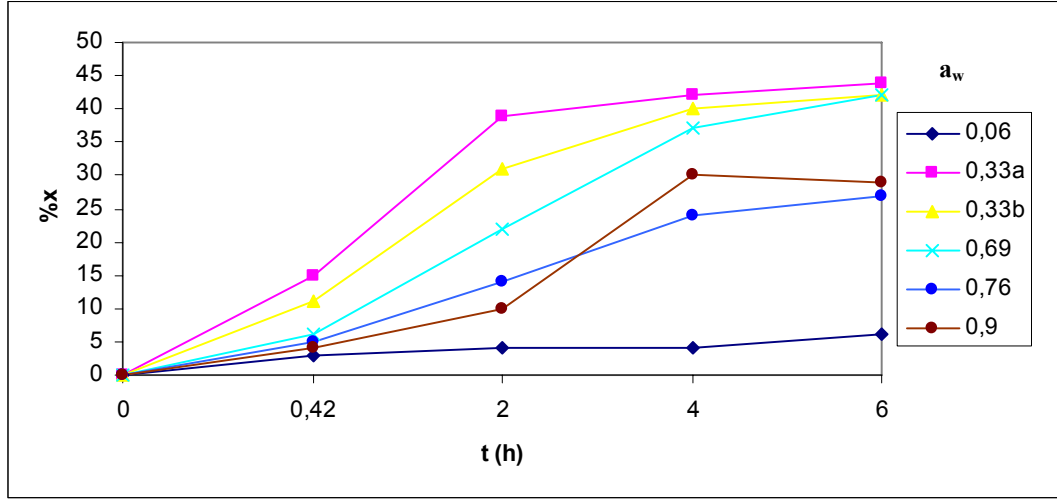
Tuz çiftleri ile yapılan deneylerde farklı substrat derişimlerinde çalışılmış ve substrat derişiminin tepkime başlangıç hızına etkisi incelenmiştir. Farklı substrat derişimlerinde zamanla örnek alınarak zamana karşı dönüşüm değerleri elde edilmiş ve Şekil 4.17, 4.18, 4.19 ve 4.20’de görülen grafikler oluşturulmuştur. Bu verilerden $t-C_A$ grafikleri (Ek-7) çizilerek Eşitlik 2.14 yardımı ile hızlar hesaplanmıştır.



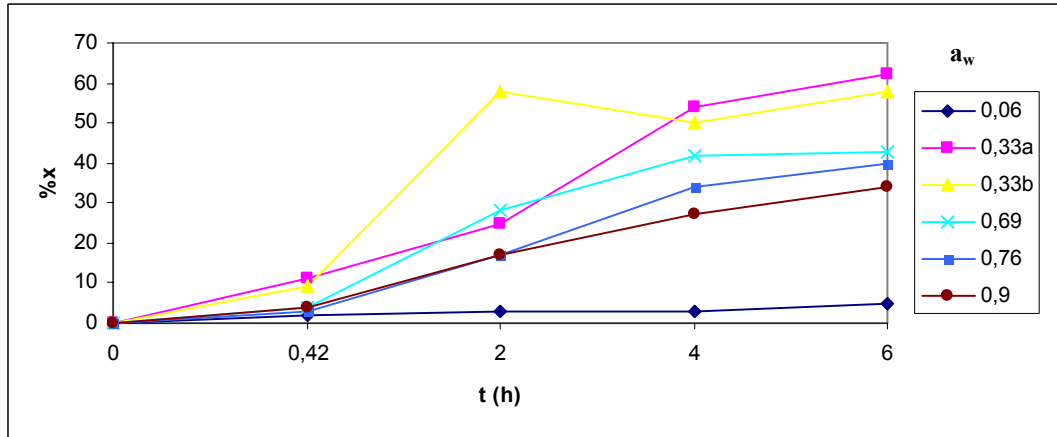
Şekil 4.17 50 mM substrat derişiminde farklı a_w değerlerinde zamanla dönüşümün değişimi (0.1 g tuz T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici: Kaprik asit)



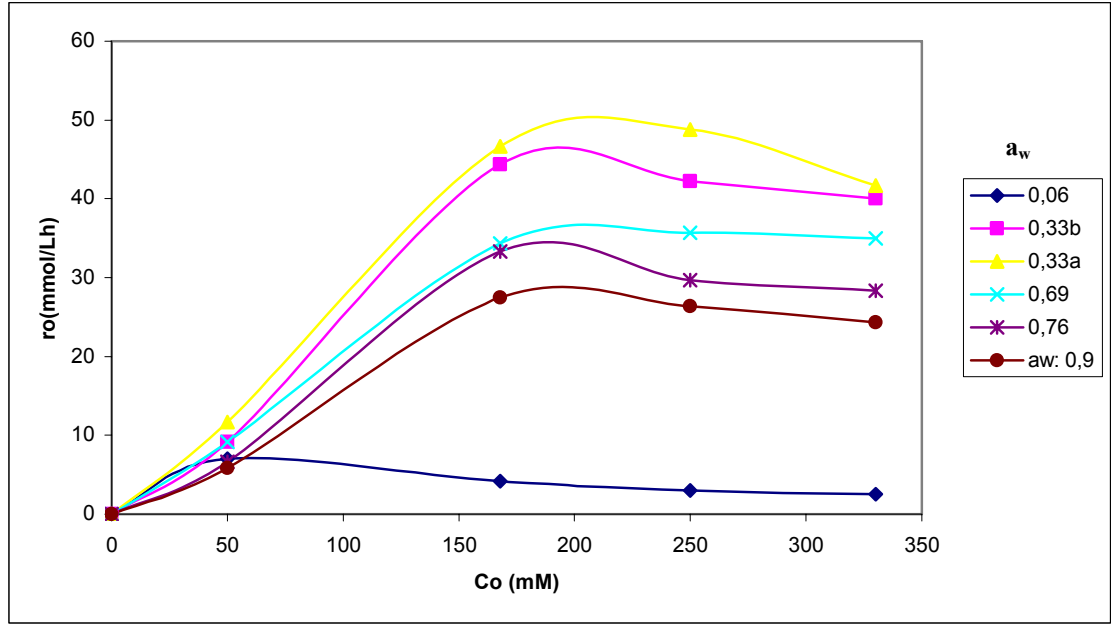
Şekil 4.18 168 mM Substrat derişiminde zaman-dönüşüm ilişkisi (0.1 g tuz T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici: Kaprik asit)



Şekil 4.19 250 mM substrat derişiminde farklı a_w değerlerinde zamanla dönüşümün değişimi (0.1 g tuz T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici: Kaprik asit)



Şekil 4.20 330 mM substrat derişiminde farklı a_w değerlerinde zamanla dönüşümün değişimi (0.1 g tuz T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP Açıl verici: Kaprik asit)



Şekil 4.21 Farklı substrat derişimleri ve a_w değerlerinde başlangıç hızı değerleri (0.1 g tuz T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP)

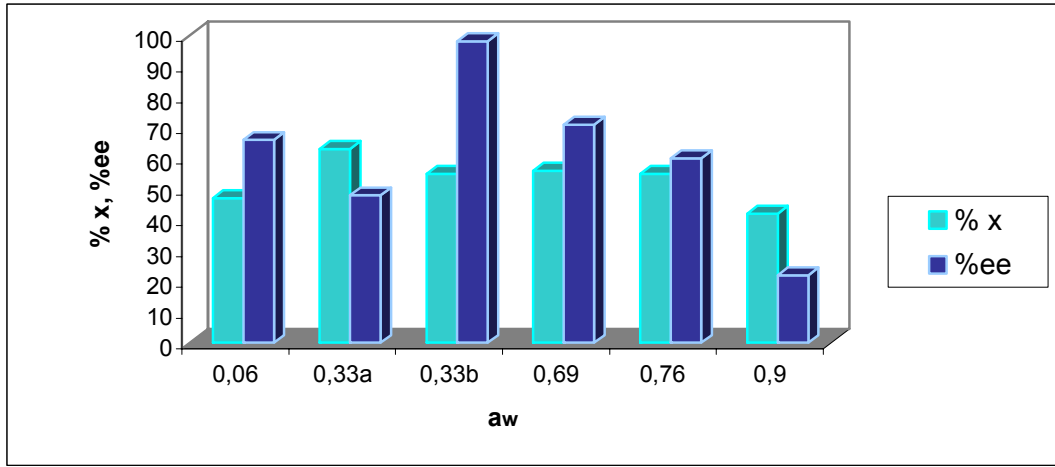
Başlangıç hızına göre substrat derişimi grafiğinde (Şekil 4.21) değişik su aktivitelerinde elde edilen sonuçlar gösterilmektedir. Şekil 4.27'de görüldüğü gibi optimum tepkime hız değeri $a_w = 0.33$ de elde edilmiştir. Tüm su aktivite değerlerinde elde edilen eğriler incelendiğinde; bir optimum değerden sonra tepkime hızında bir düşme ve belli bir noktadan sonra sabit kalma gözlenmektedir.

Kvittingen ve arkadaşları 1992 yılında bütanoik asitin bütanol ile *Candida rugosa* lipazıyla esterleşme tepkimesinde enzim miktarı, çözücü türü ve substrat derişimi incelemiş olup; yapılan çalışmada $\text{Na}_2\text{SO}_4(10/0)$ tuz hidrat çifti olarak kullanılmıştır. Bu çalışma için de substrat derişimi artırıldığı durumda yüksek su aktivitesi değerinde enzim aktivitesi ve dolaylı olarak tepkimenin başlangıç hızı arttığı gözlemlenmiştir.

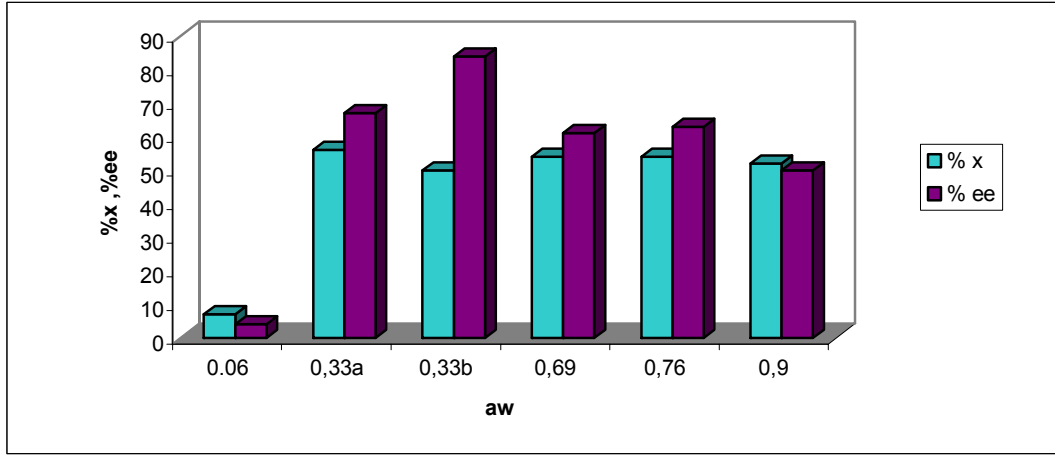
4.2.3 Substrat derişiminin enantiyoseçimliliğe etkisi

Düşük su aktivitesi değerlerinde enzimin çalışması için gerekli suyun ortam tarafından çekilmesi nedeni ile katalitik aktivite düşmektedir. Görüldüğü üzere $a_w = 0.06$ değeri için sadece düşük substrat derişiminde (50 mM) yüksek ee değerine ulaşılmakta diğer substrat derişimlerinde ise çok düşük dönüşüm ve ee değerleri gözlenmektedir.

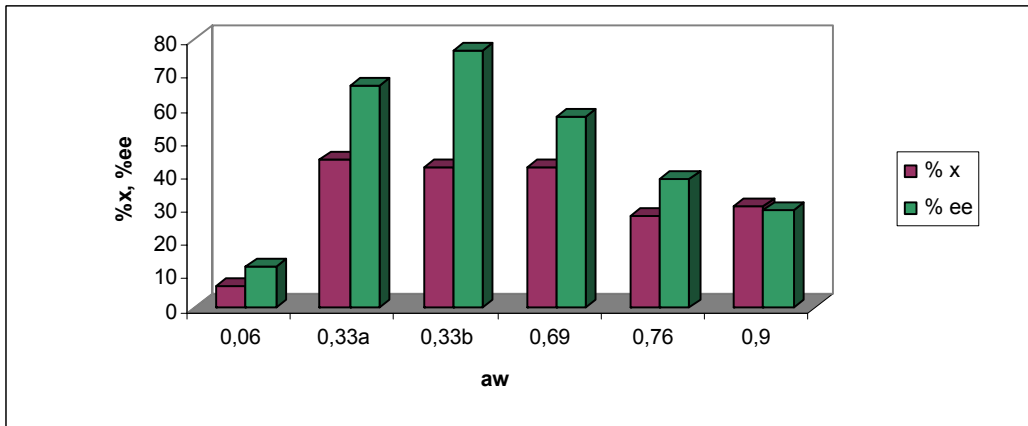
Tuz cinsinin etkisini belirlemek amacı ile aynı su aktivitesi değerine sahip farklı iki tuz çifti kullanılmıştır. 0.33 su aktivitesi değerine sahip $C_2H_3NaO_2$ (0/3) ve $MnCl_2(2/4)$ ile birbirine yakın fakat farklı sonuçlar elde edilmiştir. $MnCl_2(2/4)$ tuzu tüm substrat derişimlerinde en iyi sonucu vermiştir. 50 mM Substrat derişiminde % 55 dönüşümde %93 ee ile en iyi seçimliliğe ulaşılmıştır. Farklı a_w ve substrat derişmi değerlerinde gerçekleştirilen deneyleri Şekil 4.22 - 4.25’de görülmektedir.



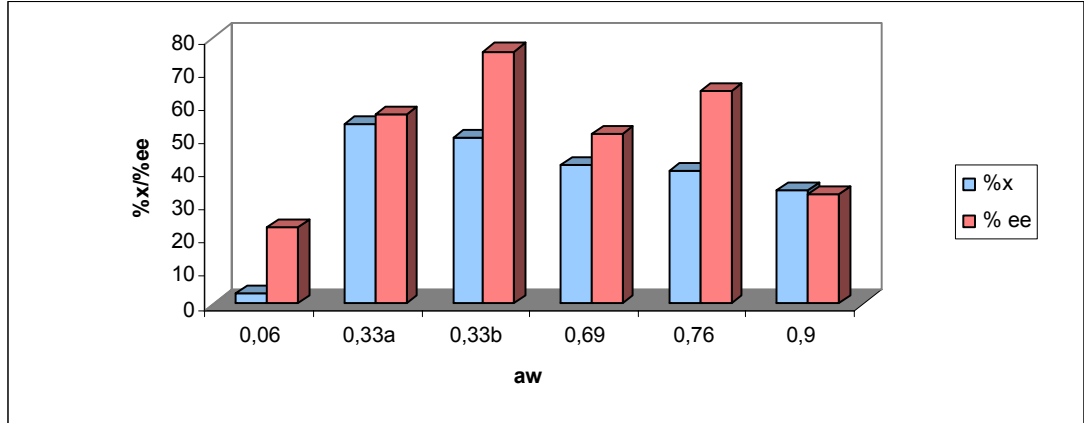
Şekil 4.22 50 mM substrat derişiminde farklı a_w değerlerinde dönüşüm ve ee değerleri (0.1 g tuz, T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici: Kaprik asit)



Şekil 4.23 168 mM substrat derişiminde a_w ile dönüşüm ve ee'nin karşılaştırılması (0.1 g tuz :40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici: Kaprik asit)

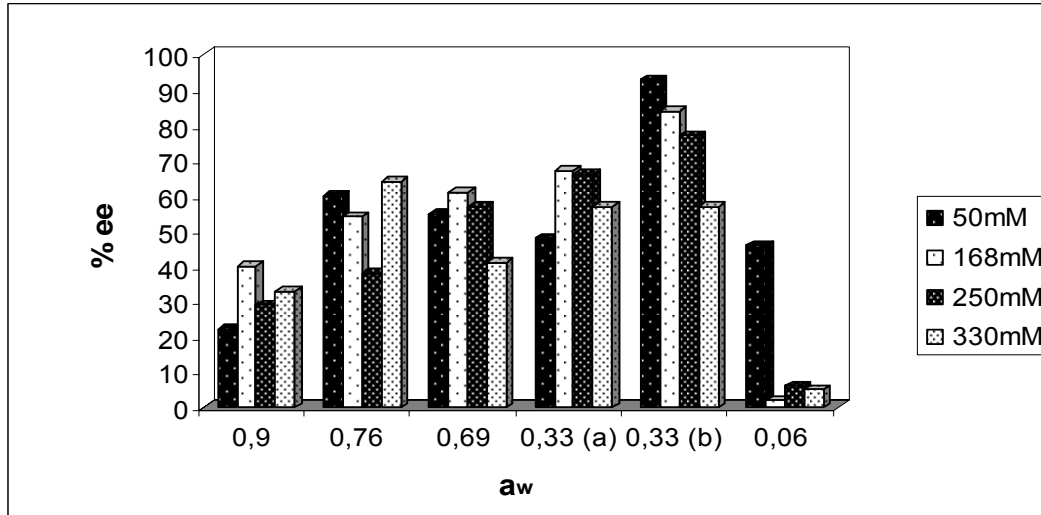


Şekil 4.24 250M substrat derişiminde a_w ile dönüşüm ve ee'lerin karşılaştırılması (0.1 g tuz T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici: Kaprik asit)

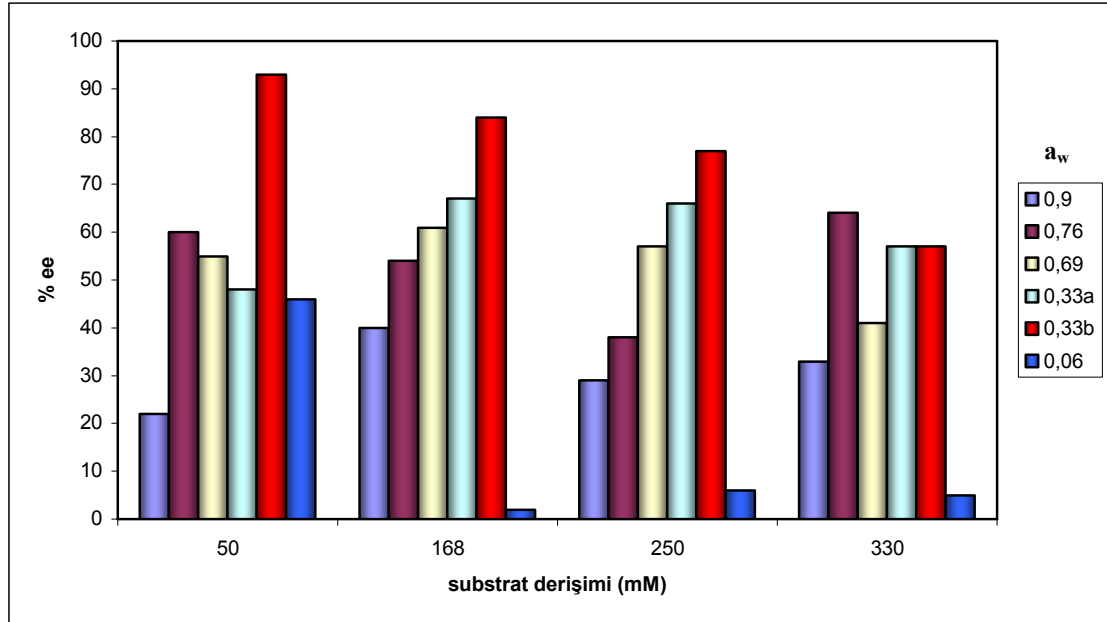


Şekil 4.25 330M substrat derişiminde a_w ile dönüşüm ve ee'lerin karşılaştırılması (0.1 g tuz T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici: Kaprik asit)

Buradaki a_w değerleri ile ifade edilen tuz çiftleri ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar Şekil 4.26 ve 4.27'de özetlenmiştir. Şekil 4.26 farklı substrat derişimlerinde, ee'nin a_w ile değişimini içermektedir. a_w değeri 0.33 olan $MnCl_2$ (6/0) tuzu ile tüm substrat derişimlerinde en yüksek ee değerlerine ulaşılırken, substrat derişimi arttıkça ee değerinin de azaldığı görülmüştür. Bu tuz için en yüksek ee değeri, 50 mM substrat derişiminde % 93 olarak elde edilmiştir (% 55 dönüşüm oranında). Şekil 4.27'de ise farklı a_w değerlerinde ee'nin substrat derişimi ile değişimi özetlenmiştir.



Şekil 4.26 Farklı substrat derişimlerinde % ee'nin a_w ile değişimi (0.1g tuz T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici: Kaprik asit)



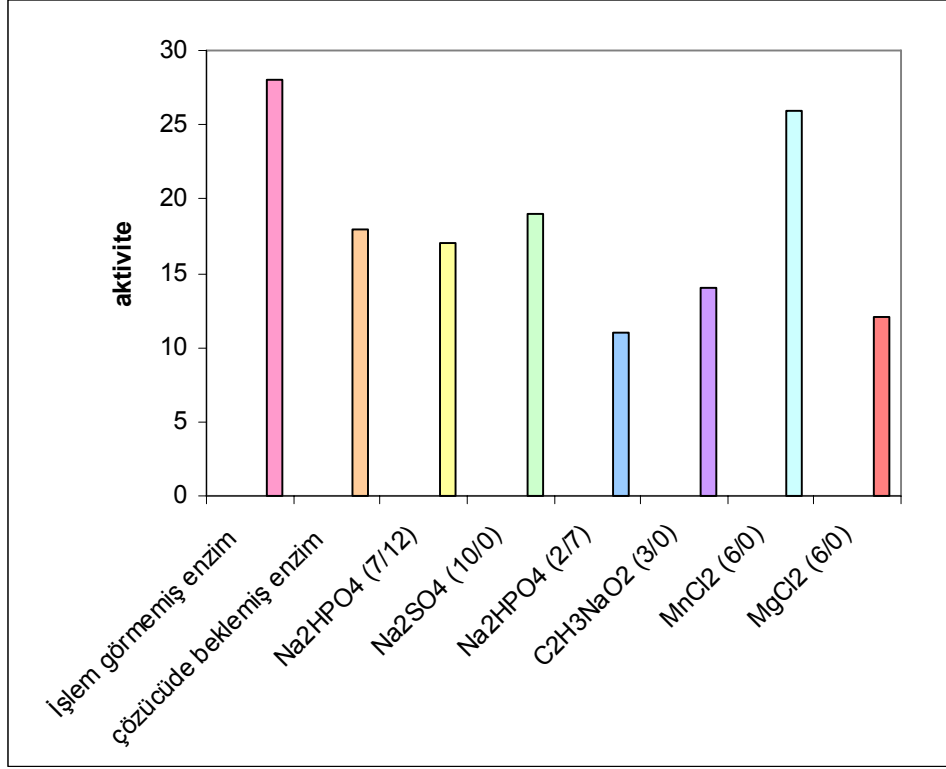
Şekil 4.27 Farklı a_w değerlerinde ee'nin substrat derişimi ile değişimi (0.1 g tuz T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici: Kaprik asit)

Högberg ve arkadaşları (1993) 2-metil alkanoik asitin *Candida rugosa* ve *Pseudomonas* lipazları katalizli esterleşme tepkimesinde tuz hidrat çiftleri kullanarak sabit bir su aktivitesi değerinde (0.15 ve 0.76) çalışmışlardır. *Pseudomonas* lipazları su aktivitesinden bağımsız görünse de CRL ortama eklenen su miktarına bağı olarak farklı enantioseçimlilik göstermiştir.

4.2.4 Tuz hidrat çiftlerinin enzim aktivitesine etkisi

Tuz hidrat çiftleri ile yapılan su aktivitesi kontrolünde tuz hidrat çiftleri tepkime ortamına direk olarak eklenmektedir. Dolayısı ile enzim aktivitesi üzerinde bir etkilerinin olabileceği düşünülerek Bölüm 3.2.3'de açıklanan Ph-Stat yöntemi ile enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Aktivitenin hesaplanmasına örnek Ek 6'da verilmektedir. Hiçbir işlem görmemiş, sadece

çözücü ortamında tepkime süresi kadar bekletilmiş ve farklı tuzların varlığında bekletilmiş enzimlerin aktiviteleri Şekil 4.28’de görülmektedir.



Şekil4.28 Tuz çiftlerinin enzim aktivitesine etkisi

Hiç işlem görmemiş olan lipazın aktivitesi 28U iken, çözücü içinde bekletilen enzimin aktivitesi 18 U’ya düşmektedir. Yüksek a_w değerlerinde bu değer çok fazla değişmezken düşük a_w değerinde daha da düşük bir seviyeye gerilemektedir. Oysa $MnCl_2(6/0)$ tuzunda enzim aktivitesi işlem görmemiş enzimin aktivitesinden biraz düşüktür. Enzim $a_w = 0.33$ değerinde ve $MnCl_2(6/0)$ tuzu ile en yüksek aktiviteye (26U) ulaşmıştır.

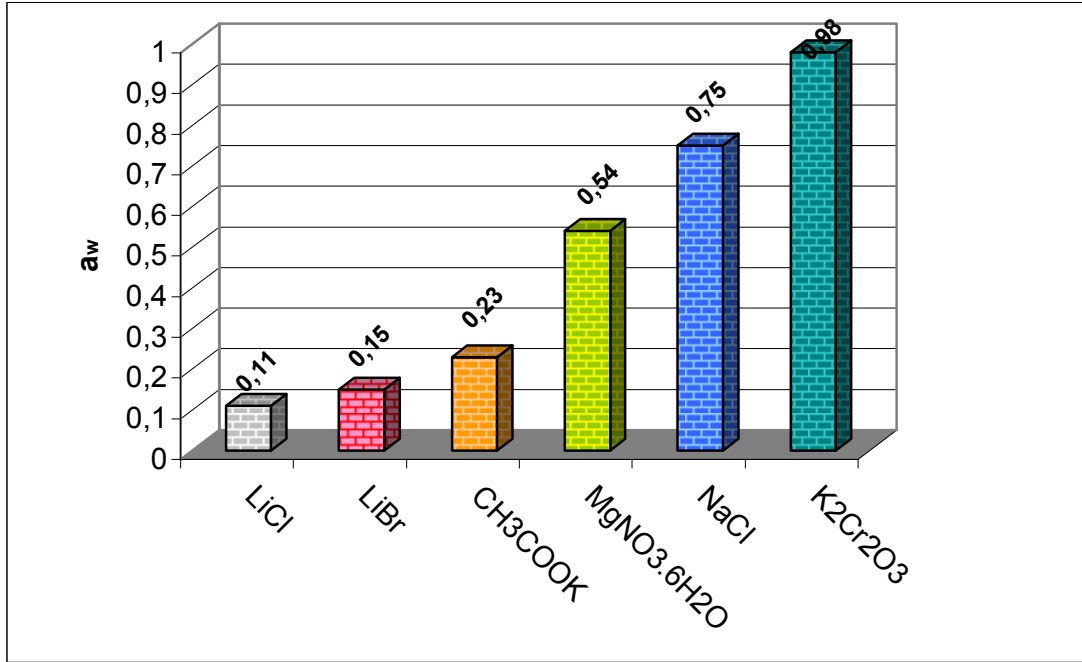
Whetje ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları çalışmada *R. arrhizus*, *C. rugosa*, *Pseudomonas* sp. lipazları katalizörlüğünde dekanolik asit ve dodekanolün esterleşme tepkimesini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan çözücülerin substratları çözmede değişik özellikler gösterdiğini ve bu özelliklerin substratların termodinamik aktivitesini ve dolaylı olarak ölçülen enzim aktivitesini etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca 3 farklı lipaz

kaynağı ile yapılan çalışmalarda enzim aktivitesine su aktivitesinin etkisi farklı substrat derişimlerinde incelenmiştir. Sabit substrat derişiminde 0.064'ten 0.97'ye kadar değişik su aktivitesi değerlerinde enzim aktiviteleri ölçölmüş olup *Rhizopus arrhizus* lipazının kullanıldığı ölçömlerde, düşük su aktivitesi değerinde yüksek enzimatik aktiviteye ve 0.33'lük su aktivitesi değerinde ise optimum değere ulaşıldığı görölmüştür. Aynı çalışmada değişik substrat derişimlerinde çıkarılan su aktivitesi profiline göre; düşük substrat derişimlerinde, su aktivitesinin 0.064 olduğu durumda, enzim aktivitesi optimuma ulaşmakta ve derişim arttırıldıkça enzim aktivitesi azalmaktadır. Bu durum genel olarak, düşük substrat derişimlerinde, yüksek enzim aktivitesi, düşük su aktivitesinde elde edilirken, yüksek substrat derişimlerinde, yüksek enzim aktivitesi, yüksek su aktivitesi değerinde elde edilmesi olarak açıklanmaktadır.

4.3 Doygun Tuz Çözeltileri ile a_w Kontrolü

Doygun hale getirilen tuz çözeltileri ile yeterli bir süre aynı atmosfer ortamında tutulan tepkime ortamının su aktivitesi gaz fazda dengeye gelmektedir. Doygun tuz çözeltileri ile sadece başlangıç a_w değeri ayarlanmaktadır. Esterleşme tepkimesi sonunda su açığa çıktığından dolayı ortamın su aktivitesi sürekli değişmektedir.

Çalışmalarda a_w değerleri 0.1 ile 0.98 arasında değişen tuzlar kullanılmıştır. Kullanılan tuzlara ait a_w değerleri Şekil 4. 29'da görölmektedir.

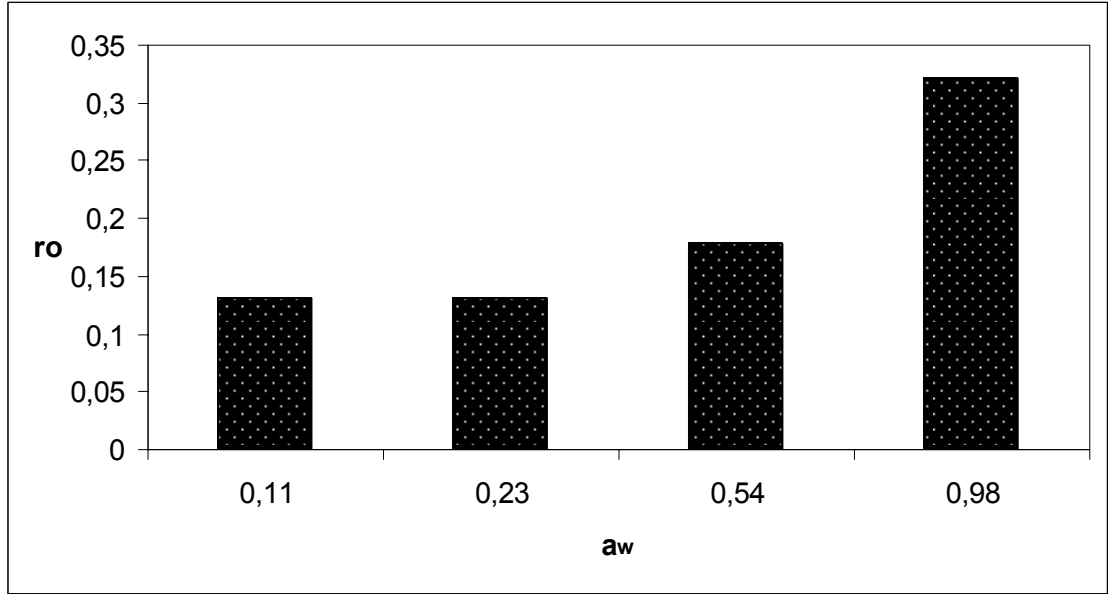


Şekil 4.29 Doygun tuz çözeltilerinin a_w değerleri

4.3.1 Doygun tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde tepkime başlangıç hızı

Wehtje ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları çalışmada sekonder alkollerin dekanolik asit ile organik ortamda esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonunda doymuş tuz çözeltileri kullanılarak su aktivitesi kontrolü yapılmıştır. Burada enzim ve tepkime ortamı 16 saat süre ile kapalı ortamda doymuş tuz çözeltileri ile ön dengeye getirilmiştir. Çalışma sonucunda enantioseçimlilik ve a_w arasında bir ilişki kurulamamıştır. Tepkime hızları, alkol derişimi arttıkça, her iki enantiyomer için de artmış fakat enantioseçimlilik değişmemiştir. Yine Wehtje ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları başka bir çalışmada 5-metil-2-hekzanon içinde lipaz katalizli (Lipozym IM 20 ve Novozym SP 435) esterleşme tepkimelerinde yarı geçirgen tüp ve doymuş tuz çözeltileri kullanılarak sürekli a_w kontrolü yapılmış ve farklı reaktör tiplerine uygulanmıştır. Lipozym IM 20 ile 0.33 a_w değerinde her reaktör tipinde iyi sonuçlara ulaşılmıştır.

Doygun tuz çözeltileri ile su aktivitesi kontrolü yapılan deneylerde tepkime başlangıç hızları incelendiğinde yüksek su aktivitesi değerlerinde yüksek tepkime hızına ulaşıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.30).



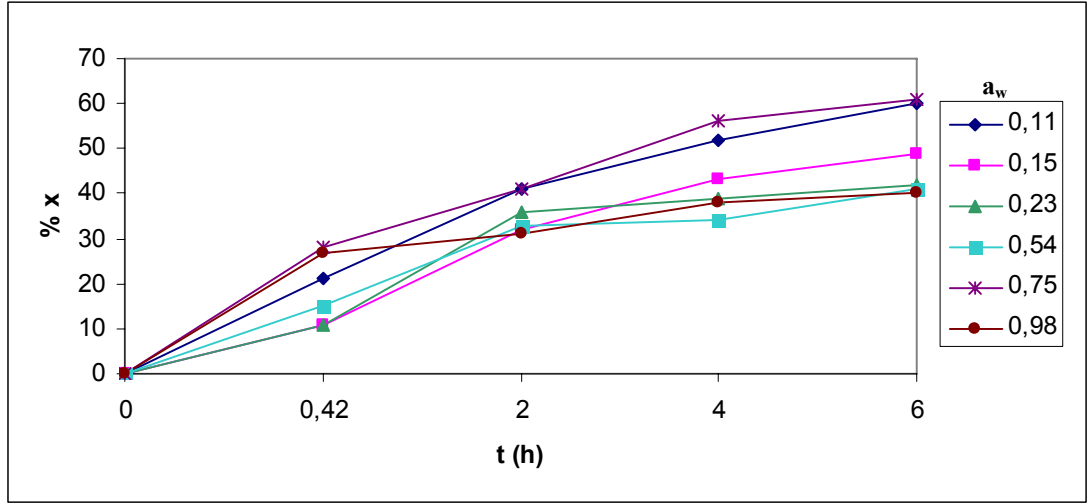
Şekil 4.30 Doygun tuz çözeltileri ile ro

Yapılan deneyler sonucunda, sadece başlangıç a_w değeri kontrolü yapıldığında iyi bir su aktivitesi kontrolünün gerçekleştirilemediği, yüksek başlangıç a_w değerlerinde ise başlangıç hızının arttığı görülmüştür.

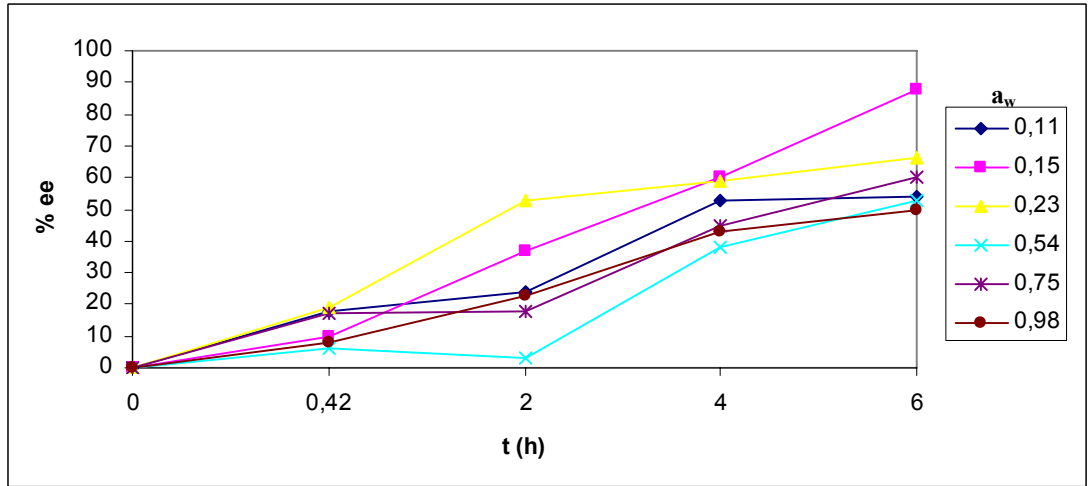
4.3.2 Doygun tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm

Doygun tuz çözeltileri hazırlandıktan sonra çözücü ve enzim ağız kapalı desikatörde bir hafta süre bekletilmiştir. Bu süre boyunca a_w atmosferden dengeye gelmiş ve tepkime ortamının başlangıç a_w değeri ayarlanmıştır. Çalışmaların birinci aşamasında elde edilen optimum koşullarda elde edilen optimum koşullarda gerçekleştirilen deneylerde ortamın su aktivitesi bu şekilde kontrol edilmiştir.

Doygun tuz çözeltileri ile su aktivitesinin kontrol edildiği deneylerde zamanla elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile oluşturulan Şekil 4.31 ve Şekil 4.32’ de zamanla dönüşüm ve enantiyomerik aşırılık değerlerindeki değişim görülmektedir.

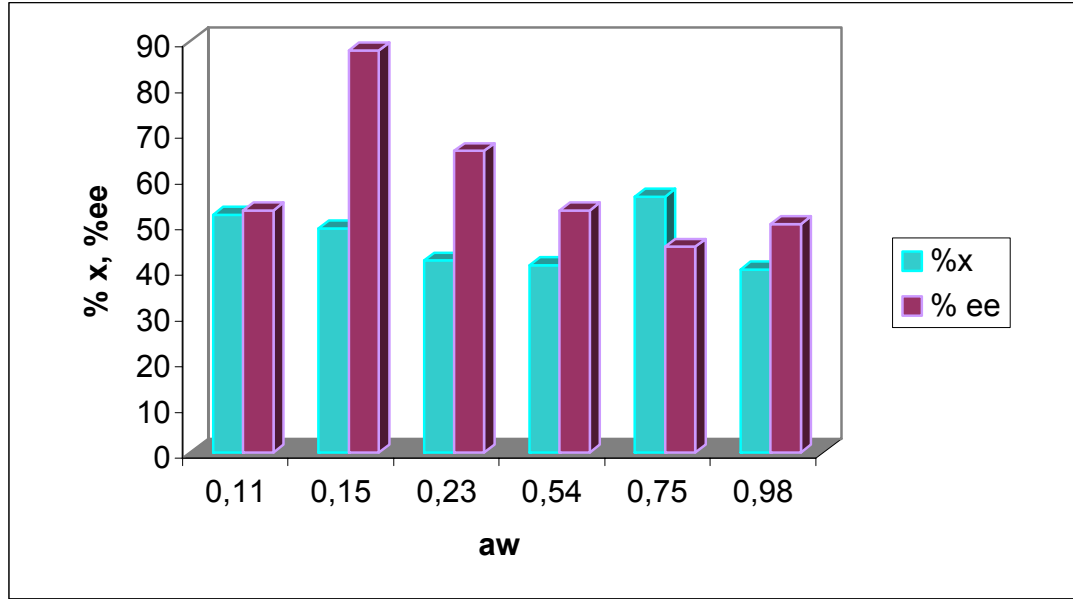


Şekil 4.31 Doygun tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde tepkime süresi ile dönüşümün değişimi (T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici:Kaprık asit)



Şekil 4.32 Doygun tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde tepkime süresi ile enantiyomerik aşırılığın değişimi (T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici:Kaprık asit)

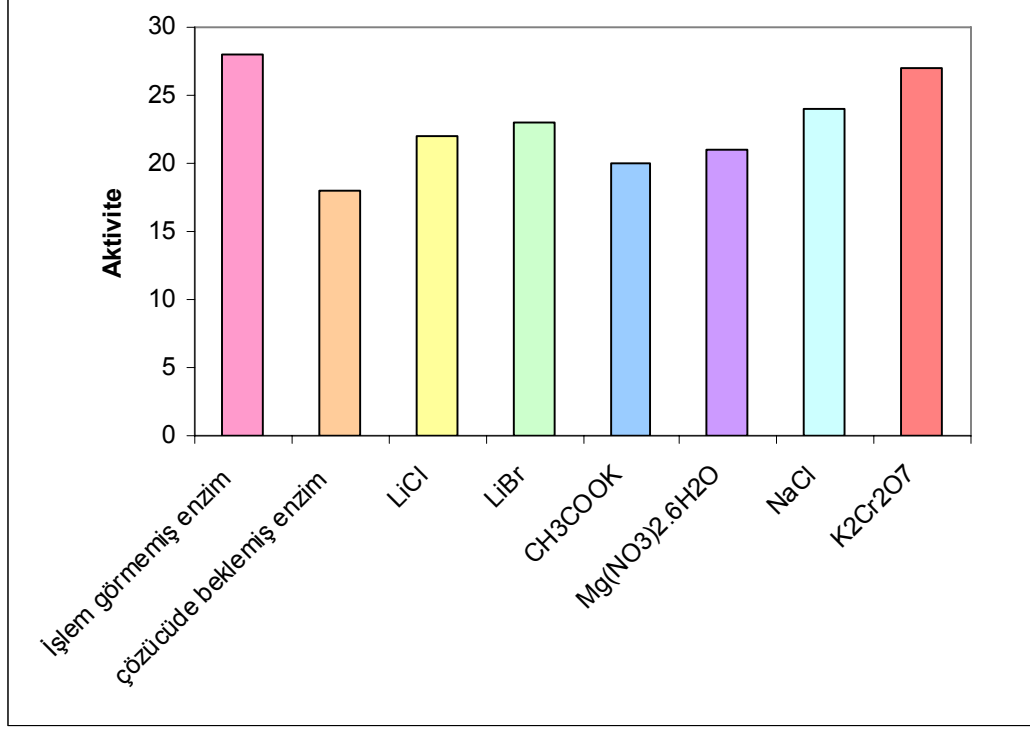
Şekil 4.33’ den de görüldüğü gibi $a_w=0.15$ ’te %88 ile en yüksek ee değerine ulaşılmıştır.



Şekil 4.33 Doygun tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde farklı a_w değerlerinde x ve ee değerleri (T:40 °C, N: 150 rpm, Çözücü: TMP, Açıl verici: Kaprik asit)

Ducret ve arkadaşları (1998) ibuprofen (2-(4-izo-butilfenil)propiyonik asit))'in Novozym 435 katalizli esterleşme tepkimesini su aktivitesi kontrollü ortamda incelemişlerdir. Sabit su aktivitesi değerlerinde de hidrofobik çözücüler, hidrofilik çözücülerde olduğundan daha yüksek enzim aktivitesi elde edilmesini sağlamışlardır. En yüksek enantiyoseçimlilik, düşük tepkime hızında gerçekleşmiştir. Bunun nedeni olarak su aktivitesinin, iki izomer ile tepkime hızları üzerine farklı etkileri olması düşünülmektedir. Su içeriği hem termal kararlılık hem de enzim aktivitesi üzerinde önemli etkiye sahiptir. *Rhizomucor miehei* lipazı farklı çözücülerde aynı a_w değeri ile (0.3) en iyi sonuçlara ulaşılmıştır.

4.3.3 Doygun tuz çözeltileri ile a_w kontrolünde enzim aktivitesi



Şekil 4.34 Doygun tuz çözeltileri başlangıç a_w değeri belirlenen tepkime ortamının enzim aktivitesine etkisi

Şekil 4.34’de doymuş tuz çözeltileri ile su aktivitesi kontrolü yapılan tepkime ortamında enzim aktiviteleri görülmektedir. Bu yöntem uygulandığında enzim aktivitesinde fazla değişim gözlenmemiştir.

5. SONUÇLAR

Yüksek lisans çalışmasında (R,S)-1-fenil-1-propanolün lipaz katalizli esterleşme tepkimesi ile kinetik rezolüsyonu ile R ve S enantiyomerlerin birbirinden en yüksek verimle ayrılması amaçlanmıştır. Rasemik 1-fenil 1-propanolün esterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu iki adımda gerçekleştirilen bir çalışmadır. Çalışmanın ilk aşamasında tepkime parametreleri incelenmiştir. Bu kapsamında enantiyomerik saflıkta 1-fenil 1-propanol'ün esterleşme tepkimesi ile elde edilmesine, enzim türünün, açıl verici ve çözücü türünün, moleküler elektrik miktarının ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. İkinci aşamasında ise elde edilen en uygun koşullarda su aktivitesi kontrolü iki farklı yöntem kullanılarak sağlanmış böylece su aktivitesinin etkisi belirlenmiştir. Doygun tuz çözeltileri ile yapılan su aktivitesi kontrolü deneylerinde enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Tuz hidrat çiftleri ile su aktivitesi kontrol deneylerinde ise enzim aktivitesinin yanı sıra farklı substrat derişimlerinde tepkime başlangıç hızları incelenmiştir.

Çalışmalara ilk olarak lipaz kaynağı seçimi ile başlanmıştır. Esterleşme tepkimesi serbest Amona Lipase PS from *Buckholderia cepacia*, PS flouresans, Lipase from *Mucor meihei*, Novozym 735 (*Candida antartica* Lipase A), Novozym CALB-L (*Candida antartica* Lipase B) ve tutuklu; Amona Lipase PS-CI (immobilized on seramic), Novozym 435, Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM, Lipase acrylic resin from *Candida antartica* lipaz enzimleri biyokatalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir. Serbest ve tutuklu enzimler karşılaştırıldığında, serbest enzimler ile gerçekleştirilen tepkimelerin tutuklu enzimlerle gerçekleştirilenlere oranla çok yavaş ilerlediği ve sonuçta düşük enantiyomerik aşırılık ve dönüşüm değerlerine ulaşıldığı gözlenmiştir. İncelenen enzimler içerisinde en yüksek enantiyomerik aşırılık değerleri Novozym 435 enzimi ile elde edilmiştir. Novozym 435 enziminin en önemli başarısı ise tepkimeyi çok kısa sürede ve yüksek enantiyoseçimlilikte katalizleyebilmesidir.

Yapılan literatür araştırması sırasında açıl verici türünün de kinetik rezolüsyon çalışmalarında önemli bir parametre olduğu görülmüştür. Farklı zincir uzunluğuna sahip

palmitik asit, miristik asit, laurik asit, kaprik asit, hekzanoik asit, stearik asit ve valerik (Pentanoik) asit kullanılmıştır. Açıl verici denemelerinde çözücü olarak izooktan kullanılmıştır. Kaprik asit ve laurik asit ile en iyi sonuçlar elde edilmiş ve çözücü seçiminde her iki açıl verici ile çalışılmıştır.

Yapılan çalışmalar çözücü türünün tepkimenin enantiyomerik aşırılık (ee) büyük ölçüde etkilediğini göstermiştir. Çalışmalarda farklı log P değerlerine sahip benzen, izooktan, heptan, sikloheksan, oktan ve tersiyer butil metil eter kullanılmıştır. Novozym 435 enzimi ile hemen hemen tüm çözücü türlerinde iyi sonuçlar elde edilmiş olup en iyi sonuca izooktan (2,2,4-tri metil pentan) ile ulaşılmıştır.

Moleküler elek tepkime ortamında bulunan su miktarını ayarlamakta kullanılan su tutucu ajan görevi görmektedir. Moleküler eleğin ortamdaki suyu uzaklaştırmanın yanında enzim davranışını etkilediğine dair çalışmalar literatürde mevcuttur. Zeolit moleküler elekler kation değiştirme yeteneklerinden dolayı enzimler üzerinde dramatik şekilde asit-baz etkisine sahiplerdir. Elde edilen sonuçlar moleküler elek miktarının lipaz katalizli enantiyoseçimli esterleşme tepkimeleri üzerinde önemli etkilere sahip olduğunu açıkça göstermektedir. İzooktanın çözücü olarak kullanıldığı tepkimelerde moleküler elek miktarının belli bir orana kadar artmasıyla, ee değerlerinde artış gözlenmiştir.

Tepkime sıcaklığı enzimatik tepkimeler üzerinde büyük etkiye sahiptir. Yapılan deneylerde Ayrıca sıcaklık artışı tepkime hızını etkilemiş ve tepkime süresinde azalmaya neden olmuştur. Yüksek sıcaklıklarda enzimler katalitik aktivitelerini kaybedebilmektedir. Bu da enzimin üç boyutlu yapısının yüksek sıcaklıklarda bozulmasıyla ilgilidir. Yapılan deneyler Novozym 435 enziminin 0 °C ile 50 °C arasındaki sıcaklıklarda enantiyoseçimli esterleşme tepkimesini katalizlediğini göstermiştir.

En uygun sıcaklık 40°C olarak bulunmuştur. Sıcaklığın artması veya azalmasıyla enantiyoseçimlilikte düşüş gözlenmiştir. 40°C’de çözücü olarak izooktan açıl verici olarak ise laurik asit kullanıldığında %40 dönüşümde, %85 ee değerine ulaşılmıştır.

Deneysel çalışmaların ilk aşamasında elde edilen optimum koşullar enzim; Novozym 435, çözücü; izooktan, açıl verici; kaprik asit ve sıcaklık 40°C olarak belirlenmiş ve çalışmaların ikinci kısmına bu koşullarda çalışılmaya devam edilmiştir.

Çalışmaların ikinci kısmını oluşturan su aktivitesi kontrol deneylerinde iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntemde tuz hidrat çiftleri tepkime ortamına direk olarak eklenmekte, ikinci yöntemde ise tepkime ortamının a_w değeri doymuş tuz çözeltileri ile gaz fazdan dengelenmektedir. Tuz hidrat çiftleri ile yapılan a_w kontrol deneylerinde, su aktivitesinin yanı sıra tuz cinsinin de etkisinin incelenmesi için aynı su aktivitesi değerine sahip farklı iki tuz kullanılmıştır. 0.33 su aktivitesi değerine sahip $C_2H_3NaO_2$ (0/3) ve $MnCl_2(2/4)$ ile birbirine yakın fakat farklı sonuçlar elde edilmiştir. $MnCl_2(2/4)$ tuzu tüm substrat derişimlerinde en iyi sonucu vermiştir. 50 mM substrat derişiminde % 55 dönüşümde %93 ee ile en iyi seçimliliğe ulaşılmıştır.

Başlangıçta ortama eklenecek tuz miktarının belirlenmesi amacı ile 168 mM substrat derişiminde farklı tuz miktarları ile deneyler yapılmıştır. Moleküler elek ile su aktivitesi kontrolünde $a_w = 0.33$ değerinde en yüksek ee'ye ulaşılmıştı. Benzer şekilde burada da her iki tuz miktarında $a_w = 0.33$ için sonuçların aynı doğrultuda olması beklenmektedir. Düşük miktarda tuz çiftinin ortamın su aktivitesini kontrol etmekte yetersiz olduğu görülmüştür. Bu nedenle deneylere 0.1 gr tuz kullanılarak devam edilmiştir.

Tuz çiftleri ile 50, 168, 250 ve 330 mM substrat derişimlerinde çalışılmış ve elde edilen dönüşüm değerleri yardımı ile başlangıç hızları hesaplanarak, substrat derişiminin başlangıç hızına etkisi incelenmiştir. Düşük su aktivitesi değerlerinde enzimin çalışması için gerekli suyun ortam tarafından çekilmesi nedeni ile katalitik aktivite düşmektedir. Görüldüğü üzere $a_w = 0.06$ değeri için sadece düşük substrat derişiminde (50 mM) yüksek ee değerine ulaşılmakta diğer substrat derişimlerinde ise çok düşük dönüşüm ve ee değerleri gözlenmektedir.

a_w değeri 0.33 olan $MnCl_2$ (6/0) tuzu ile tüm substrat derişimlerinde en yüksek ee değerlerine ulaşılırken, substrat derişimi arttıkça ee değerinin de azaldığı görülmüştür. Bu tuz için en yüksek ee değeri, 50 mM substrat derişiminde % 93 olarak elde edilmiştir (% 55 dönüşüm oranında).

Su aktivitesinin çok düşük olduğu durumda ($a_w = 0.06$) düşük derişimde optimum hıza ulaşmıştır. Yüksek substrat derişiminde yüksek su aktivitesine sahip tuz kullanıldığında en yüksek tepkime hızına ulaşmıştır. Optimum tepkime hız değeri $a_w = 0.33$ de elde edilmiştir. Tüm su aktivite değerlerinde elde edilen veriler incelendiğinde; bir optimum değerden sonra tepkime hızında bir düşme ve belli bir noktadan sonra sabit kalma gözlenmektedir.

Hiç işlem görmemiş olan lipazın aktivitesi 28U iken, çözücü içinde bekletilen enzimin aktivitesi 18 U'ya düşmektedir. Yüksek a_w değerlerinde bu değer çok fazla değişmezken düşük a_w değerinde daha da düşük bir seviyeye gerilemektedir. Oysa $MnCl_2(6/0)$ tuzunda enzim aktivitesi işlem görmemiş enzimin aktivitesinden biraz düşüktür. Enzim $a_w = 0.33$ değerinde ve $MnCl_2(6/0)$ tuzu ile en yüksek aktiviteye (26U) ulaşmıştır.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2007. Web sitesi. <http://www.biorefining.com/pdf/PharmaChemSept2003.pdf>,
Erişim tarihi: 21.04.2007.
- Anonim. 2007. Web sitesi. <http://www.pharma-solutions.basf.com>, Erişim tarihi:
23.04.2007.
- Anonim. 2007. Web sitesi <http://chemistry.semo.edu/crawford/ch186/lectures/ch20/html>
Erişim tarihi: 23.04.2007.
- Atkins, R.C. and Carey, F.A. 1997. Organic Chemistry. The McGraw-Hill companies,
Inc, 184–212, New York.
- Bell, G., Hailing, P.J., Moore, B.D., Partridge, J., and Rees, D.G., 1995. Biocatalyst
Behaviour In Low-Water Systems, *TIBTECH*, 13,468-473
- Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas and G., Sih, C.J. 1982. Quantative analyses of
biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *Journal of American Chemical
Society*, **104**,7294-7299.
- Dossat, V., Comdes, D., Marty, A., 1999. Continuous enzymatic transesterification
of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the
glycerol production. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 194-200.
- Faber, K. 2000. Biotransformations in organic chemistry.1-26, New York.
- Fernandez-Lorente G., Fernández-Lafuente R., Palomo J. M, Mateo C., Bastida A.,
Coca J., Haramboure T., Hernández-Justiz O., Terreni M. and Guisán J. M.,
2001, 'Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of
hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium', *Journal of
Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11649–656
- Fernandez-Lafuente R., Armisen P., Sabuquillo P, Fernández-Lorente G. and Guisán
J.M., 1998, 'Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic
supports', *Chemistry and Physics of Lipids* **93**, 185–197
- Frings K., Koch M. and Hartmeier W., 1999, 'Kinetic resolution of 1-phenyl ethanol
with high enantioselectivity with native and immobilized lipase in organic
solvents', *Enzyme and Microbial Technology* **25**, 303–309

- Fontes, N., Partridge, J., Halling, P.J. and Barreiros, S. 2002. Zeolite molecular sieves have dramatic acid-base effects on enzymes in nonaqueous media. *Biotechnology and Bioengineering*, **77**; 296-305.
- Gandhi, N.N., Patil, N.S., Sawant, S.B. and Joshi J.B. 2000. Lipase-catalyzed esterification. *Catal. Rev.-Sci. Eng.*, **42(4)**, 439-480.
- Ghanem, A. And Aboul-einen, H. Y. 2004, Lipase mediated chiral resolution of rasemates in organic solvents, *Tetrahedron: Asymmetry Report* **78**, 15: 33331 – 3351
- Ghanem, A. and Schuring, V. 2003. Entrapment of *Pseudomonas cepacia* lipase with peracetylated β -cyclodextrin in sol-gel: application to kinetic resolution of secondary alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**, 2547-2555
- Goderis, H.L., Ampe, G., Feyten, M.P., Fouwe, B.L., Guffens, W.M., Van Cauwenbergh, S.M., and Tobback, P.P., 1987. Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnol Bioeng.*, **XXX**, 258-266.
- Hallberg, M.L., Wang, D., and Harrod, M., 1999. Enzymatic synthesis of wax esters from rapeseed fatty acid methyl esters and a fatty alcohol, *JAOCs*, **76**, 2, 183-187.
- Hailing, P. J., 1992. Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media, *Biotechnology Techniques*, **6**, 271-276.
- Hailing, P. J., 1994. Thermodynamic predictions for biocatalysis in non-conventional media: Theory, test and recommendations for experimental design and catalysis. *Enzyme and Microbiat Technology*, **16**, 178-205.
- Hailing, P.J. and Valivety, R.H., 1992. Physical-chemical nature of low water systems for biocatalysis: especially phase behaviour, water activity and pH, In: *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, 13-21.
- Irimescu, R., Saito, T., Kato, K. 2004. Enzymatic kinetic resolution of primary alcohols by direct esterification in solvent-free system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **27**; 69-73.
- Inokuchi, J., Mason, I., Radin, N.S. 1987. Antitumor activity via inhibition of glycosphingolipid biosynthesis, *Cancer Letter*, **38**: 23-30.

- İşbakan, N. 2006. Lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde enantiyomerik saflıkta 1-fenil 1-propanolün transesterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi, 107s., Ankara.
- Jaeger, K.E. and Reetz, M.T., 1998, Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Tibtech*, **16**: 396 – 403
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B.W. and Reetz, M.T. 1999. Bacterial Biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**; 315-351.
- Kapucu, N., 2003, Lipaz Enziminin Katalizlediği Bir Ester Üretiminin Süperkritik CO₂'de İncelenmesi. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi, 195 s., Ankara
- Kim, J.E., Han, J.J., Yoon, J.H., Rhee, IS., 1998. Effect of salt hydrate pair on lipase-catalyzed regioselective monoacylation of sucrose. *Biotechnol. Bioeng.*, **57(1)**, 121-125
- Kivittingen, L., Sjursnes, B., Anthonsen, T., and Hailing, P.J., 1992. Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalysed synthesis in organic media: A practical procedure for organic chemists, *Tetrahedron*, **48**, 13,2793-2802.
- Klibanov, A.M., 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 241-246
- Kösali, Y. K. 2005. α -Hidroksi ketonların enantiyoseçimli olarak biyotransformasyonla üretimi. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi, 72 s., Ankara
- Krishna, S.H. and Karanth, N.G. 2002. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews*, Vol. **44**, No:4, 499-591.
- Liu Y.Y., Xu J.H., Wu H.Y. and Shen D., 2004, 'Integration of purification with immobilization of *Candida rugosa* lipase for kinetic resolution of racemic ketoprofen', *Journal of Biotechnology* **110**, 209–217
- Ljunger, G., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., 1994. Enzymatic synthesis of octyl-p-glucoside in octanol at controlled water activity *Enzyme Microb Technol*, **16**, 751-755
- Palomo J. M., Segura R. L., Fuentes M., Ortiz C.C., Guisán J.M. and Lafuente R. F., 2006, 'Unusual enzymatic resolution of ($\pm$)-glycidyl-butyrate for the production of (*S*)-glycidyl derivatives' *Enzyme and Microbial Technology* **38**, 429–435

- Palomo J.M., Muñoz G., Fernández-Lorente G., Mateo C., Fuentes M., Guisan J.M. and Fernández-Lafuente R., 2003, 'Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins: Hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyroyl-2-phenylacetic acid' *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **21**, 201–210
- Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Mateo C., Ortiz C., Fernandez-Lafuente R. and Guisan J.M., 2002, 'Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters' *Enzyme and Microbial Technology* **31**, 775–783
- Pregolato M., Terreni M., Fuentes I.E., Alcantara Leon A.R., Sabuquillo P., Fernandez-Lafuente R. and Guisan J.M., 2001, 'Enantioselective enzymatic hydrolysis of racemic glycidyl esters by using immobilized porcine pancreas lipase with improved catalytic properties', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**, 757–763
- Rakels, J.L.L., Straathof, A.J.J., Heijnen, J.J. 1993. A simple method to determine the enantiomeric ratio in enantioselective biocatalysis. *Enzyme Microbial Technology*, **15**; 1051-1056.
- Reetz, M. T., Zonta A., Vijayakrishnan V. and Schimossek K., 1998, 'Subject-index terms: Enantiomer separation; Chiral stationary phases, LC Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: magnetic separation of heterogeneous biocatalysts', *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **134**, 251–258
- Reetz M. T. and Jaeger K. E., 1998, 'Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases', *Chemistry and Physics of Lipids* **93**, 3–14
- Rosel, C.M. and Vaidya, A.M., 1995. Twin-core packed-bed reactors for organic-phase enzymatic esterification with water activity control. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **44**, 283-286
- Rosell, C.M., Vaidya, A.M. and Hailing, P.J. 1996. Continuous insitu water activity control for organic phase biocatalysis in a packed bed hollow fiber reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, **49**, 284-289

- Sakai, T., Kishimoto, T., Tanaka, Y., Ema, T. and Utaka, M. 1998. Low –Temperature method for enhancement of enantioselectivity in the lipase-catalyzed kinetic resolutions of solketal and some chiral alcohols. *Tetrahedron Letters*, **39**; 7881–7884
- Secundo, F., Riva, S. and Carrea, G. 1992. Effects of medium and of reaction conditions on the enantioselectivity of lipase in organic solvents and possible rationales. *Tetrahedron Asymmetry*, **3(2)**, 267-280
- Sharma, R., Chisti Y. Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, **19**, 627-662
- Sheldon, R.A. 1993. Chirotechnology. Marcel Dekker, Inc, 47-83, New York.
- Sjurnes, B., Kivittingen, L., Anthonsen, T., 1992. Control of water activity by using salt hydrates in enzyme catalysed esterifications in organic media. *In. Biocatalysis in Non Conventional Media.*, (Ed. J. Tramper), p.451-457.
- Soyer, A. 2007. Lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde kinetik rezolüsyon ile enantiyomerik saflıkta 1-fenil 1-propanolün üretimi. Yüksek lisans tezi. Ankara Üniversitesi, 80s., Ankara.
- Suan, C. and Sarmidi, M.R. 2004. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **28**, 111-119.
- Suginaka, K., Hayashi, Y., Yamamoto, Y., 1996. Highly selective resolution of secondary alcohols and acetoacetates with lipases diketene in organic media. *Tetrahedron Asymmetry*, **7.4**, 1153-1158.
- Svensson, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P. and Mattiasson, B., 1994. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 549-556.
- Tüzün, C., 1997, Biyokimya, Palme yayınları, Ankara
- Ujang Z., Husain W.H., Seng M.C. and Rashid A.H.A., 2003, 'Kinetic resolution of 2-(4-chlorophenoxy) propionic acid using *Candida rugosa* lipase', *Process Biochemistry* **38**, 1483-/1488
- Ujang, Z. and Vaidya, A.M., 1998. Stepped water activity control for efficient enzymatic interesterification, *Appl Microbiol. Biotechnol.* **50**, 318-322.

- Uzura, A., Katsuragi, T. and Tani, Y. 2001. Optimal conditions for production of (R)-1-phenylpropanol by *Fusarium moniliforme* Strain MS 31. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. **92**, No.3, 288-293.
- Valivety, R.H., Hailing, P.J. and Macrae, A.R., 1992a, Effect of water activity on rate of lipase catalysed esterification. *Biocatalysis in Non Conventional Media*, (Ed.J.Tramper), p.549-555.
- Valivety, R.H., Hailing, P.J. and Macrae, A.R., 1992b. Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta*, **1118**,218-222
- Valivety, R.H., Hailing, P.J., Peilow, A.D. and Macrae, A.R., 1992c. Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1122**,143-146.
- Valivety, R.H., Hailing, P.J. and Macrae, A.R., 1993. Water as a competitive inhibitor of lipase-catalysed esterification in organic media. *Biotechnology Letters*, **15(11)**, 1113-1138.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J. H., Graille, J. and Haas, M. J. 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **9**, 113-148
- Wehtje, E., Costes, D., Adlercreutz, P., 1997a. Enantioselectivity of lipases : effect of water activity. *J. Mol Cat. B:Enzym.*, **3**, 221-230
- Wehtje, E., Kaur, J., Adlercreutz, P., Chand, S., and Mattiasson, B., 1997b. Water activity control in enzymatic esterification processes. *Enzyme and Microbial Technology*, **21**, 502-510.
- Wilson L., Palomo J.M.,Fernández-Lorente G., Illanes A.,Guisán J.M.and Fernández-Lafuente R., 2005, 'Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *alcaligenes* sp. via strong adsorption on hydrophobic supports' *Enzyme and Microbial Technology*,123-130.
- Wu, J.-Y., Liu, S.-W., 2000. Influence of alcohol concentration in lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproxen in isooctan : under controlled water activity. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 124-130.
- Yang, Z., Robb, D.A., Hailing, P.J., 1992. Variation of tyrosinase activity with solvent at a constant water activity. *Biocatalysis in Non Conventional Media*,

(EdJ.Tratnper), p.585-592.

Zacharis, E., Omar, I.C., Partridge, J., Robb, D.A, Hailing, P.J., 1997. Selection of salt hydrate pairs for use in water control in enzyme catalysis in organic solvents, *Biotechnol Bioeng.*,55(2), 367-374.

EKLER

EK 1 Tuz çiftleri için A ve B sabitlerinin değerleri

EK 2 1-fenil-1-propanol'ün özellikleri

EK 3 Açıl vericilerin fiziksel özellikleri

EK 4 Çözücülere ait bazı özellikler

EK 5 Hazırlanan örneklere ait kromatogramlar

EK 6 Örnek Hesaplama

EK 7 Farklı substrat derişimlerinde t-Ca grafikleri

EK 8 Toplu sonuçlar

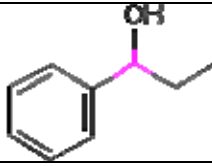
EK 1 Tuz çiftleri için A ve B sabitlerinin değerleri

Salt pair	Su Kapasitesi mmol g ⁻¹	Max T °C	A	B	Data T °C
Na-tartr.2/?	4.3/8.6	c 57	-	-	20-25
Na ₂ SO ₄ .10/0	31	32	1.033	337.3	15-33
Na ₂ HPO ₄ .12/7	14.0	35	1.619	512.3	15-30
Na ₂ CO ₃ .10/7	10.5	32	1.178	387.8	15-32
Na ₂ CO ₃ .7/1	26	35	1.304	434.9	15-35
ZnSO ₄ .7/6	3.5	c 38	1.781	590.3	15-35
Na ₂ B ₄ O ₇ .10/5?	13.1	c 60	1.283	445.5	20-35
Na ₂ HPO ₄ .7/2	18.6	48	1.370	472.4	15-25
ZnSO ₄ .6/1	18.6	c 49	1.276	449.5	15-50
Sr(OH) ₂ .8/1	26	>100	1.711	584.5	10-40
KCr(SO ₄) ₂ .12/6	12.0	>60	1.398	503.2	15-70
Na ₄ P ₂ O ₇ .10/0	22	c 80	1.458	527.0	35-80
K ₄ Fe(CN) ₆ .3/0?	7.1	87	1.373	511.8	15-80
Na ₂ HAsO ₄ .7/5	6.4	c 55	1.641	599.6	15-28
Na ₂ S ₂ O ₃ .5/2	12.1	48	1.427	553.9	19-35
NaBr.2/0	14.4	50	1.334	531.9	15-50
SrCl ₂ .6/2	15.0	61	1.386	549.2	20-60
CuSO ₄ .5/3	8.0	96	1.725	660.5	15-80
Ba(OH) ₂ .8/1	22	>100	1.778	681.2	10-45
CoCl ₂ .6/4	8.4	48	1.742	672.4	20-50
Na ₂ HAsO ₄ .5/1	14.0	c 67	1.341	553.9	18-33
NaAc.3/0	22	c 58	1.627	651.6	15-50
Na ₂ CO ₃ .1/0	8.1	c 110	1.861	738.7	15-80
NiCl ₂ .4/2	9.9	64	1.231	554.3	25-65
BaCl ₂ .2/1	4.1	102	1.987	784.8	20-80
CuSO ₄ .3/1	9.4	>100	1.779	729.2	25-80
MgHPO ₄ .3/1	11.5	>100	-0.799	-66.3	30-80
Zn(NO ₃) ₂ .6/4	6.7	c 34	0.598	403.9	15-34
Na ₂ HPO ₄ .2/0	11.2	95	1.328	630.8	20-30
BaBr ₂ .2/1	3.0	113	2.068	857.4	25-80
NH ₄ Al(SO ₄) ₂ .12/3?	19.9	c 93	2.691	1068.6	50-80
NaI.2/0	10.8	68	1.121	607.8	20-60
Ca(NO ₃) ₂ .2/0	10.0	52	1.738	823.9	20-50
SrBr ₂ .6/1	14.1	c 90	1.305	698.5	20-80
Li ₂ SO ₄ .1/0	7.8	233	0.678	507.2	25-80
Cd(NO ₃) ₂ .4/2	6.5	49	1.580	787.1	20-45
SrCl ₂ .2/1	5.1	c 145	1.785	860.5	25-85
Cd(NO ₃) ₂ .2/0	7.4	57	1.261	794.4	40-55
CaCl ₂ .2/1	6.8	c 170	0.405	538.0	17-78
MgCl ₂ .6/4	9.8	117	0.102	451.9	20-80
LiBr.2/1	8.2	32	3.370	1480.9	18-31
LiCl.1/0	16.6	>90	1.840	1055.9	18-70
MgCl ₂ .4/2	12.0	182	-	-	10-100
Zn(NO ₃) ₂ .4/2	7.6	c 38	11.753	4083.7	20-39
LiI.3/2	5.3	77	3.070	1554.3	60-72
BaCl ₂ .1/0	4.4	270	3.753	1810.2	50-80
LiI.2/1	5.9	c 77	0.499	751.1	70-80
BaBr ₂ .1/0	3.2	350	0.435	813.8	50-80

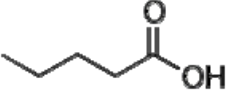
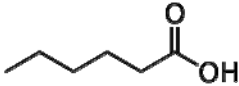
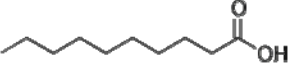
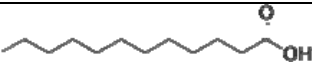
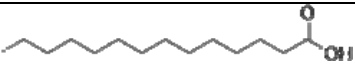
EK 1 Tuz çiftleri için A ve B sabitlerinin değerleri (devam)

Salt pair	Sıcaklık (°C)								
	20	25	30	35	40	50	60	70	80
Na-tartr.2/7	0.85	0.86	-	-	-	-	X	X	X
Na ₂ SO ₄ .10/0	0.76	0.80	0.83	X	X	X	X	X	X
Na ₂ HPO ₄ .12/7	0.74	0.80	0.85	0.90	X	X	X	X	X
Na ₂ CO ₃ .10/7	0.72	0.75	0.79	X	X	X	X	X	X
Na ₂ CO ₃ .7/1	0.66	0.70	0.74	0.78	X	X	X	X	X
ZnSO ₄ .7/6	0.58	0.63	0.68	0.73	X	X	X	X	X
Na ₂ B ₄ O ₇ .10/5?	0.58	0.61	0.65	0.69	0.72	0.80	-	X	X
Na ₂ HPO ₄ .7/2	0.57	0.61	0.65	0.69	0.73	X	X	X	X
ZnSO ₄ .6/1	0.55	0.59	0.62	0.66	0.69	X	X	X	X
Sr(OH) ₂ .8/1	0.52	0.56	0.61	0.65	0.70	0.80	-	-	-
KCr(SO ₄) ₂ .12/6	0.48	0.51	0.55	0.58	0.62	0.69	0.77	X	X
Na ₄ P ₂ O ₇ .10/0	0.46	0.49	0.52	0.56	0.59	0.67	0.75	0.83	0.92
K ₄ Fe(CN) ₆ .3/0?	0.42	0.45	0.48	0.52	0.55	0.62	0.69	0.76	0.84
Na ₂ HAsO ₄ .7/5	0.39	0.43	0.46	0.50	0.53	-	X	X	X
Na ₂ S ₂ O ₃ .5/2	0.34	0.37	0.40	0.43	0.45	X	X	X	X
NaBr.2/0	0.33	0.35	0.38	0.41	0.43	0.49	X	X	X
SrCl ₂ .6/2	0.33	0.35	0.37	0.40	0.43	0.49	0.55	X	X
CuSO ₄ .5/3	0.30	0.32	0.35	0.38	0.41	0.48	0.55	0.63	0.72
Ba(OH) ₂ .8/1	0.28	0.31	0.34	0.37	0.40	0.47	0.54	-	-
CoCl ₂ .6/4	0.28	0.31	0.33	0.36	0.39	X	X	X	X
Na ₂ HAsO ₄ .5/1	0.28	0.30	0.33	0.35	0.37	0.42	-	X	X
NaAc.3/0	0.25	0.28	0.30	0.32	0.35	0.41	X	X	X
Na ₂ CO ₃ .1/0	0.22	0.24	0.27	0.29	0.32	0.38	0.44	0.51	0.59
NiCl ₂ .4/2	-	0.23	0.25	0.27	0.29	0.33	0.37	X	X
BaCl ₂ .2/1	0.20	0.23	0.25	0.28	0.30	0.36	0.43	0.50	0.58
CuSO ₄ .3/1	0.196	0.22	0.24	0.26	0.28	0.33	0.39	0.45	0.52
MgHPO ₄ .3/1	-	-	-	-	0.26	0.25	0.25	0.25	0.24
Zn(NO ₃) ₂ .6/4	0.166	0.175	0.184	X	X	X	X	X	X
Na ₂ HPO ₄ .2/0	0.150	0.163	0.177	0.191	0.21	-	-	-	-
BaBr ₂ .2/1	0.139	0.156	0.174	0.193	0.21	0.26	0.31	0.37	0.44
NH ₄ Al(SO ₄) ₂ .12/3?	-	-	-	-	-	0.24	0.30	0.38	0.46
NaI.2/0	0.111	0.121	0.130	0.141	0.151	0.174	0.198	X	X
Ca(NO ₃) ₂ .2/0	0.085	0.094	0.105	0.116	0.128	0.154	X	X	X
SrBr ₂ .6/1	0.084	0.092	0.100	0.109	0.119	0.139	0.162	0.186	0.21
Li ₂ SO ₄ .1/0	-	0.095	0.101	0.108	0.114	0.128	0.143	0.159	0.175
Cd(NO ₃) ₂ .4/2	0.079	0.087	0.096	0.106	0.117	X	X	X	X
SrCl ₂ .2/1	0.071	0.079	0.088	0.098	0.109	0.132	0.159	0.189	0.22
Cd(NO ₃) ₂ .2/0	-	-	0.044	0.048	0.053	0.063	X	X	X
CaCl ₂ .2/1	0.037	0.040	0.043	0.046	0.049	0.055	0.062	0.069	0.076
MgCl ₂ .6/4	0.036	0.039	0.041	0.043	0.046	0.050	0.056	0.061	0.066
LiBr.2/1	0.021	0.025	0.030	X	X	X	X	X	X
LiCl.1/0	0.017	0.020	0.023	0.026	0.029	0.037	0.047	0.058	0.071
MgCl ₂ .4/2	0.01 to 0.02 throughout								
Zn(NO ₃) ₂ .4/2	0.007	0.011	0.019	0.032	X	X	X	X	X
LiI.3/2	-	-	-	-	-	0.018	0.025	0.035	X
BaCl ₂ .1/0	-	-	0.006	0.008	0.009	0.014	0.021	0.030	0.042
LiI.2/1	-	-	-	-	-	-	0.018	0.020	X
BaBr ₂ .1/0	-	-	0.006	0.006	0.007	0.008	0.010	0.012	0.013

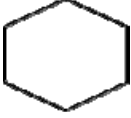
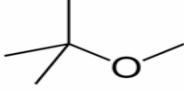
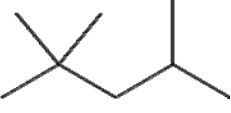
EK 2 1-fenil-1-propanol'ün özellikleri

Alkol	Yapı	Erime Nok.	Kaynama Nok.	Yoğunluk	Moleküler Ağırlık
1-fenil-1-propanol $C_9H_{12}O$		<25 °C	219 °C	0,993 g/ml	136.19368 g/mol

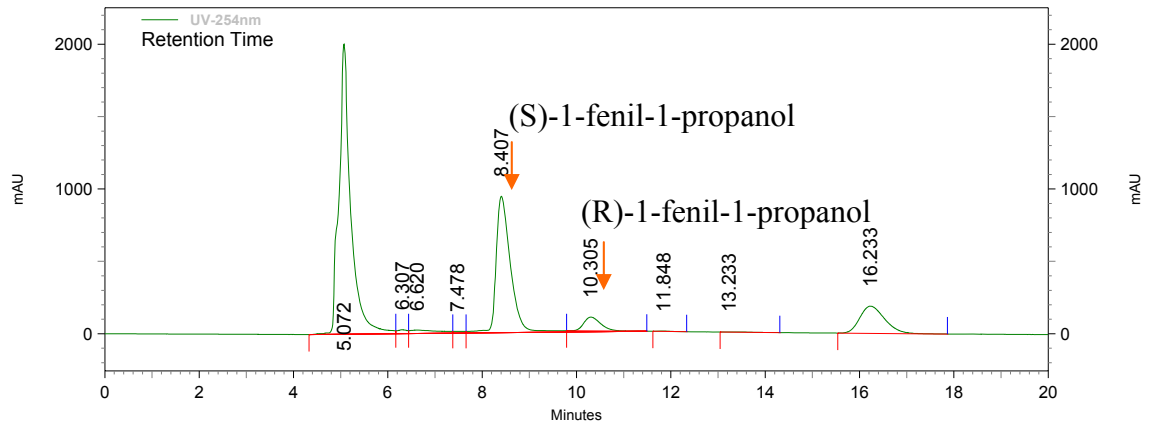
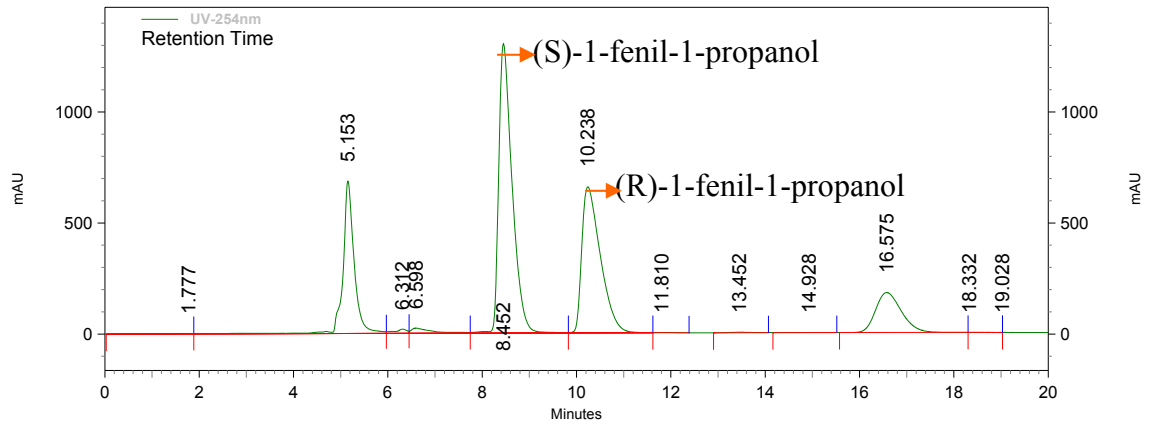
EK 3 Açıl vericilerin fiziksel özellikleri

Açıl verici	Yapı	Erime Nok.	Kaynama Nok.	Yoğunluk	Moleküler Ağırlık
Pentanoik asit $C_5H_{10}O_2$		-34.5 °C	186-187 °C	0.930 g/cm ³	102.13 g/mol
Hekzanoik asit $C_6H_{12}O_2$		-3 °C	202-203 °C	0.920 g/cm ³	116.16 g/mol
Dekanoik asit (Kaprik Asit) $C_{10}H_{20}O_2$		31 °C	269 °C	0.893 g/cm ³	172.26 g/mol
Dodekanoik asit (Laurik Asit) $C_{12}H_{24}O_2$		44-46 °C	225 °C	0.880 g/cm ³	200.32 g/mol
Tetradekanoik asit (Miristik Asit) $C_{14}H_{28}O_2$		58.8 °C	250.5 °C	0.8622 g/cm ³	228.36 g/mol
Oktadekanoik asit (Stearik Asit) $C_{18}H_{36}O_2$		69.6 °C	383 °C	0.847 g/cm ³	284.47 g/mol

EK 4 Çözücülere ait bazı özellikler

Çözücü Türü	Yapı	Erime Nok.	Kaynama Nok.	Yoğunluk	Moleküler Ağırlık	Log p (ow)
Sikloheksan C_6H_{12}		6.55 °C	80.74 °C	0.779 g/ml	84.16 g/mol	3,4
Oktan C_8H_{18}		-57 °C	125.52 °C	0.703 g/ml	114.2285 g/mol	4,9
Ter- bütıl metil eter $C_5H_{12}O$		-109 °C	55.2 °C	0.7404 g/cm ³	88.15 g/mol	1.35
2,2,4-Trimetilpentan C_8H_{18}		-107.38 °C	99.3 °C	0.688 g/ml	114.22 g/mol	4.5

EK 5 Hazırlanan örneklere ait kromatogramlar



Ek 6 pH stat yöntemi ile örnek aktivite hesaplanması

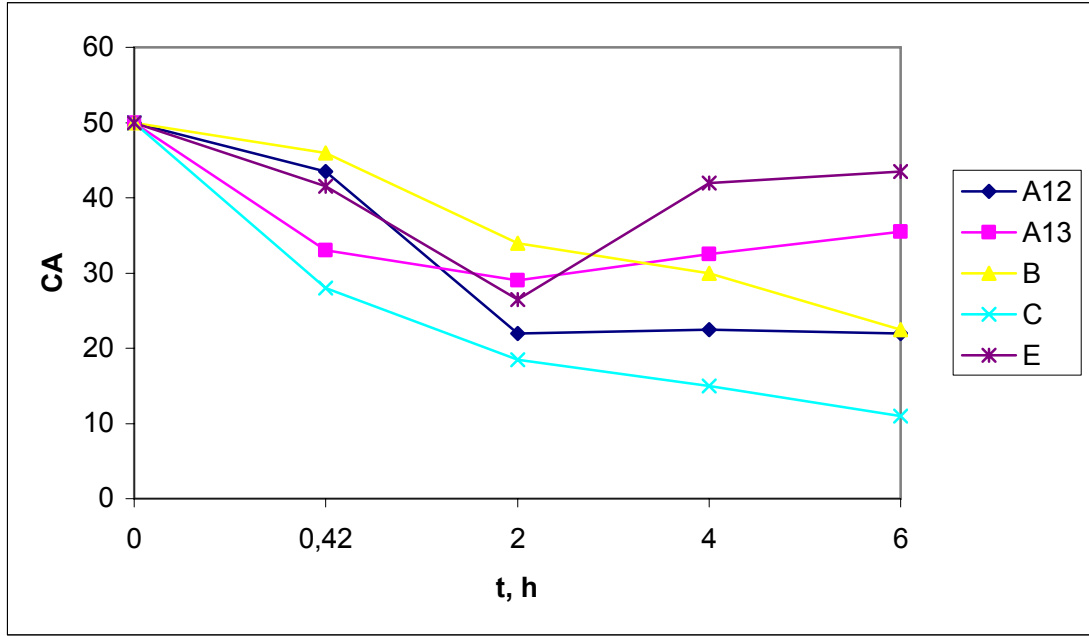
200 µl tribütrin, 10 ml 1 mM Tris-HCl tamponu (pH=7.2) içerisinde çözündükten sonra 0,5 mg enzim tampon içerisine eklenmiştir. Tepkime 40 °C’de 150 rpm hızındaki orbital çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. 10 dakika sonunda enzim, tampon ortamından filtre kağıdı ile ayrılmış ve tepkime sonlandırılmıştır. Tampon içerisine birkaç damla fenol fitalein eklendikten sonra 0,1 M NaOH çözeltisiyle titrasyon gerçekleştirilmiştir. Harcanan her mol NaOH, üç mol substrata karşılık gelmektedir. Titrasyon sonucunda 3,5 ml NaOH harcandığı durumda;

$$3.5 \text{ ml} \times 0.1 \text{ mol/L} \times 1\text{L} / 1000\text{ml} \times 10^6 \mu\text{mol/mol} \times 1/3 \times 1/10 \text{ dak} = 11.7 \mu\text{mol /dak}$$

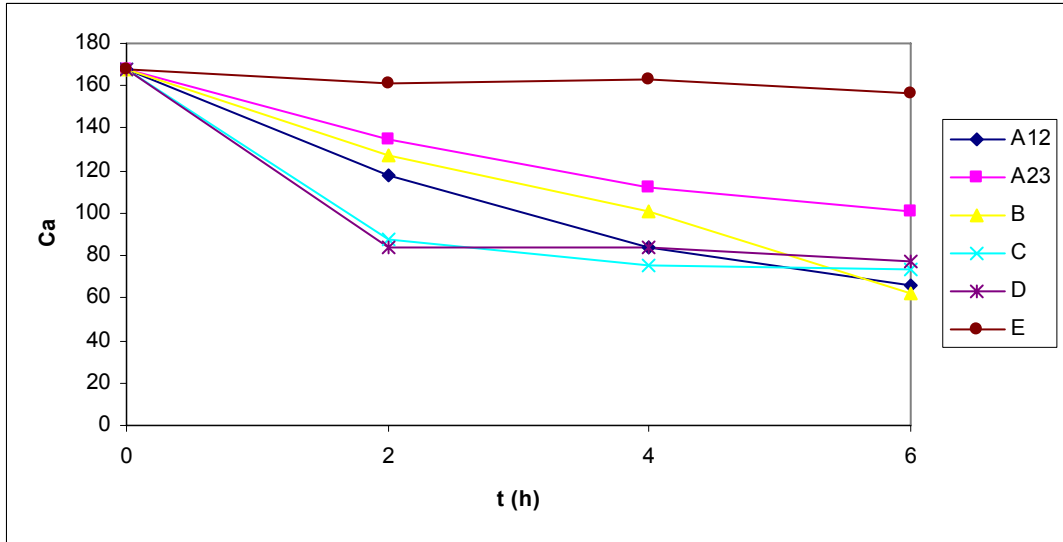
$$11.7 \mu\text{mol /dak} \times 0.1 \text{ gr enzim} / 0.05 \text{ gr enzim} = 23 \mu\text{mol /dak}$$

olarak hesaplanmıştır.

EK 7 Farklı substrat derişimlerinde t-Ca grafikleri

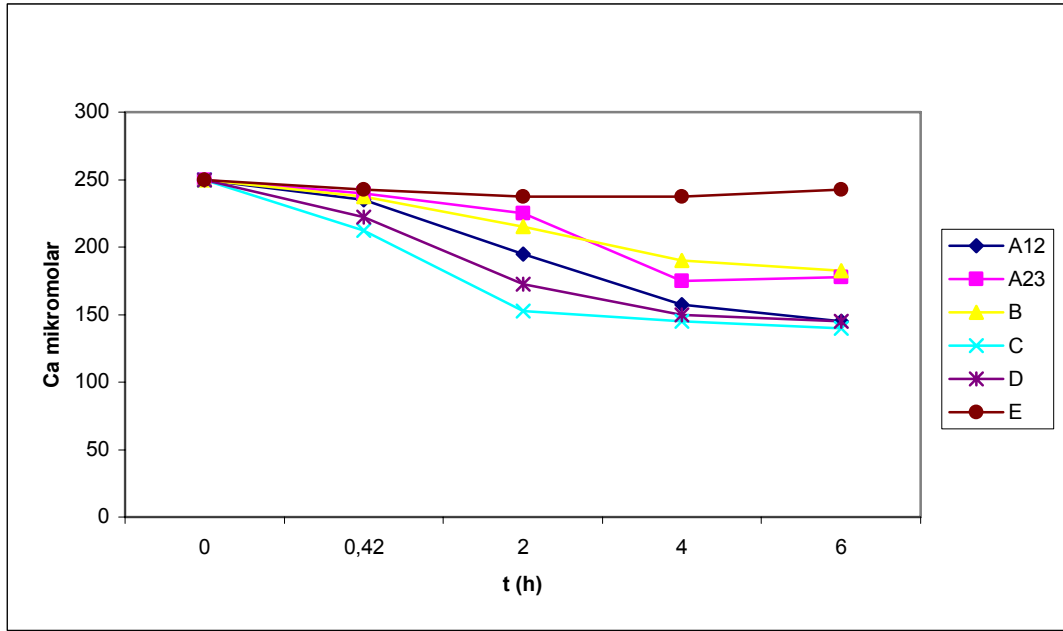


Şekil 4.45 50 M Substrat deşiminde t-Ca grafiğı

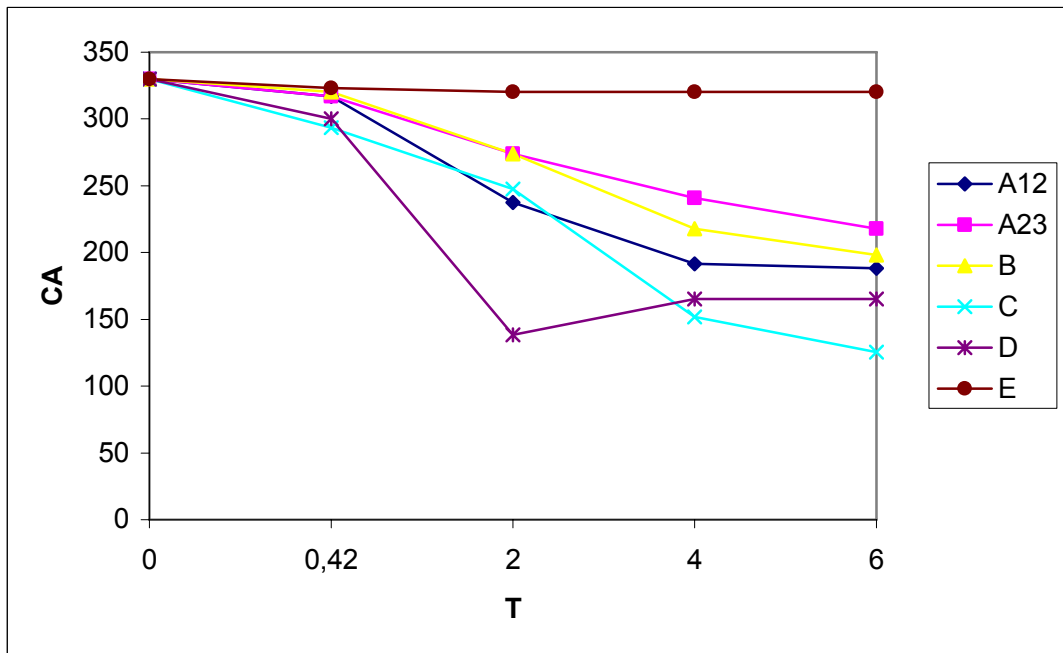


Şekil 4.46 168 M Substrat deşiminde t-Ca grafiğı (0.1 gr tuz)

EK 7 Farklı substrat deşişimlerinde t-Ca grafikleri (Devam)



Şekil 4.44 250 M Substrat deşişiminde t-Ca grafiği



Şekil 4.47 330 M Substrat deşişiminde t-Ca grafiği

Ek 8 Toplu Sonuçlar

1. ENZİM KAYNAĞI SEÇİMİ

TUTUKLU ENZİMLER

ENZİM	% x	% ee
NOVOZYM 435	65	68
<i>C. antartica</i>	55	60
LİPOZYM RM-IM	62	22
LİPOZYM TL-IM	58	36
PS-CI	65	34

SERBEST ENZİMLER

ENZİM	% x	% ee
<i>P. cepecia</i>	-	19
Ps. Flouresans	-	21
Novozyme 735 (<i>C. antartica</i> Lip A)	-	14
Novozyme CALB-L (<i>C. Antartica</i> LipB)	-	29
Porcine Pancreatic Lipase	-	11

Ek 8 Toplu Sonuçlar (devam)

2. AÇIL VERİCİ SEÇİMİ

ENZİM : Novozym 435

ÇÖZÜCÜ : İzooktan

Açıl vericiler **t (h)** **%ee** **%x**

VALERİK ASİT (C ₅ H ₁₀ O ₂)	0.5	18	53
	1.0	33	50
	1.5	57	59
	2.0	58	64
HEKZANOİK ASİT (C ₆ H ₁₂ O ₂)	0.5	19	24
	1.0	32	39
	1.5	46	53
	2.0	74	61
KAPRİK ASİT (C ₁₀ H ₂₀ O ₂)	0.5	28	37
	1.0	56	53
	1.5	79	75
	2.0	80	73
LAURİK ASİT (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	0.5	25	34
	1.0	57	61
	1.5	68	65
	2.0	84	74
MİRİSTİK ASİT (C ₁₄ H ₂₈ O ₂)	0.5	27	35
	1.0	43	59
	1.5	35	49
	2.0	40	63
STEARİK ASİT (C ₁₈ H ₃₆ O ₂)	0.5	23	55
	1.0	31	44
	1.5	61	60
	2.0	53	73

Ek 8 Toplu Sonuçlar (devam)**3.ÇÖZÜCÜ TÜRÜ SEÇİMİ**

(Enzim: Novozym 435 Mol. Elek mik. : 300mg)

Çözücü cinsi		T (h)	%ee	% dönüşüm
O K T A N	Laurik asit	0.5	18	27
		1.0	33	37
		1.5	64	55
		2.0	78	60
	Kaprik asit	0.5	18	20
		1.0	39	58
		1.5	67	65
		2.0	82	64
S İ K L O H E X A N	Laurik asit	0.5	21	32
		1.0	53	49
		1.5	70	59
		2.0	85	66
	Kaprik asit	0.5	23	39
		1.0	54	44
		1.5	72	59
		2.0	90	65
T B M E	Laurik asit	0.5	16	26
		1.0	28	35
		1.5	35	46
		2.0	40	50
	Kaprik asit	0.5	18	27
		1.0	40	52
		1.5	50	55
		2.0	61	65
T M P	Laurik asit	0.5	15	24
		1.0	38	50
		1.5	53	61
		2.0	79	72
	Kaprik asit	0.5	24	29
		1.0	53	64
		1.5	79	68
		2.0	92	70
		2.0	84	74

Ek 8 Toplu Sonuçlar (devam)

4.SICAKLIK DENEMELERİ

0°C		
Zaman(dak)	%ee	%Dönüşüm
45	9	14
90	14	28
135	18	45
180	25	32

10°C		
Zaman(dak)	%ee	%Dönüşüm
45	10	27
90	17	38
135	25	27
180	30	43

20°C		
Zaman (dak)	%ee	%Dönüşüm
30	13	23
60	16	35
90	24	48
120	27	49

30°C		
Zaman (dak)	%ee	%Dönüşüm
30	22	57
60	39	58
90	55	68
120	68	75

Ek 8 Toplu Sonuçlar (devam)

4.SICAKLIK DENEMELERİ (devam)

35°C		
Zaman	%ee	%Dönüşüm
20	20	19
40	25	22
60	31	34
80	36	56

40°C		
Zaman	%ee	%Dönüşüm
20	34	21
40	52	28
60	81	35
80	85	40

45°C		
Zaman	%ee	%Dönüşüm
20	20	17
40	23	34
60	75	55
80	85	63

50°C		
Zaman	%ee	%Dönüşüm
20	24	45
40	48	87
60	62	63
80	73	68

Ek 8 Toplu Sonuçlar (devam)

TUZ ÇİFTİ	MOLARİTE											
	50			168			250			330		
	t (h)	%x	%ee	t (h)	%x	%ee	t (h)	%x	%ee	t (h)	%x	%ee
MgCl₂(6/0) (0.06)	2	47	66	2	3	2	2	4	1	2	3	3
	4	16	46	4	4	2	4	4	4	4	3	23
	6	13	7	6	7	4	6	6	12	6	5	5
C₂H₃NaO₂(3/0) (0.33)	2	63	48	2	48	50	2	39	34	2	25	27
	4	14	6	4	55	63	4	42	56	4	54	57
	6	78	33	6	56	67	6	44	66	6	62	57
MnCl₂(6/0) (0.33)	2	42	59	2	50	59	2	31	48	2	58	44
	4	55	93	4	54	78	4	40	69	4	50	76
	6	56	74	6	50	84	6	42	77	6	58	79
Na₂HPO₄(2/7) (0.69)	2	56	37	2	27	31	2	22	22	2	28	31
	4	55	59	4	41	50	4	37	43	4	42	51
	6	56	71	6	54	61	6	42	57	6	43	41
Na₂SO₄(10/0) (0.76)	2	32	32	2	24	25	2	14	18	2	17	26
	4	40	50	4	40	44	4	24	34	4	34	50
	6	55	91	6	54	63	6	27	38	6	40	64
Na₂HPO₄(7/12) (0.90)	2	42	22	2	20	24	2	10	17	2	17	6
	4	35	23	4	33	30	4	30	29	4	27	18
	6	29	45	6	52	50	6	29	37	6	34	33

Ek 8 Toplu Sonuçlar (devam)

Doygun Tuz Çözeltileri

TUZ	t	%x	%ee
LiCl (0.11)	25 min	21	18
	2h	41	24
	4h	52	53
	6h	60	54
LiBr (0.15)	25 min	11	10
	2h	32	37
	4h	43	60
	6h	49	88
CH ₃ COOK (0.23)	25 min	11	19
	2h	36	53
	4h	39	59
	6h	42	66
MgNO (0.54)	25 min	15	6
	2h	33	30
	4h	34	38
	6h	41	53
NaCl (0.75)	25 min	28	17
	2h	41	18
	4h	56	45
	6h	61	60
K ₂ Cr ₂ O ₇ (0.98)	25 min	27	8
	2h	31	23
	4h	38	43
	6h	40	50

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe Pınar AKLAN
Doğum Yeri : Beyşehir
Doğum Tarihi : 07.03.1980
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Konya Meram Anadolu Lisesi,1998
Lisans : Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya
Mühendisliği Bölümü, 2004
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya
Mühendisliği Anabilim Dalı, Eylül 2004 - Aralık 2007

Çalıştığı Kurum/Kurumlar:

Çevre ve Orman Bakanlığı, Çevre ve Orman Uzman Yardımcısı, Ocak 2007-.....